

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS

Diversidad en los patrones de susceptibilidad fenotípica de *Fasciola hepatica* aisladas de bovinos y expuestas *in vitro* a triclabendazol

Para optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentada por el Bachiller

CÉSAR ANDREÉ MURGA MORENO

Asesores

PhD. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS

MCs. CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA

Cajamarca – Perú

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador

Nombres y apellidos: César Andreé Murga Moreno

DNI N°: 74030969

Escuela Profesional: Medicina Veterinaria

2. Asesores

Nombres y apellidos: Dr. Pedro Luis Ortiz Oblitas y MCs. Cristian Angel Hobán Vergara

Facultad: Ciencias Veterinarias

3. Grado académico o título profesional

Grado académico: Título profesional

4. Tipo de trabajo de investigación

Tipo: Tesis

5. Título del trabajo de investigación

Diversidad en los patrones de susceptibilidad fenotípica de *Fasciola hepatica* aisladas de bovinos y expuestas *in vitro* a triclabendazol

6. Fecha de evaluación: 02 de junio de 2025

7. Software antiplagio: Turnitin

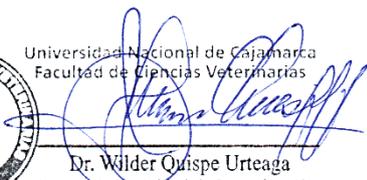
8. Porcentaje de informe de similitud: 7%

9. Código documento: oid:3117:464168898

10. Resultado de la evaluación de solicitud: Aprobado



Universidad Nacional de Cajamarca
Facultad de Ciencias Veterinarias


Dr. Wilder Quispe Urteaga
Director de la Unidad de Investigación

Fecha de emisión: 03 de junio del 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962
UNIVERSIDAD LICENCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DECANATO
Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205 Fono 076 365852



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las once horas del día treinta de mayo del dos mil veinticinco, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “**César Bazán Vásquez**” de la Universidad Nacional de Cajamarca los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis titulada: “**Diversidad en los patrones de susceptibilidad fenotípica de *Fasciola hepatica* aisladas de bovinos y expuestas *in vitro* a triclabendazol**”, asesorada por el docente, **Dr. Pedro Luis Ortiz Oblitas** y MCs. **Cristian Angel Hobán Vergara** y presentada por el Bachiller en Medicina Veterinaria: **CÉSAR ANDREÉ MURGA MORENO**.

Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación y para los efectos del caso se invitó al sustentante a exponer su trabajo.

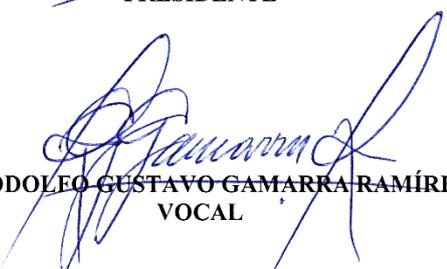
Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del Jurado Calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el Presidente invitó al público a formular preguntas concernientes al tema.

Después de realizar la calificación de acuerdo con las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el jurado calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el calificativo final obtenido de **DIECINUEVE (19)**.

Siendo las doce horas y treinta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES
PRESIDENTE


Dr. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA
SECRETARIO


Dr. RODOLEO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ
VOCAL


Dr. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS
ASESOR


MCs. CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA
ASESOR

Que nuestro emblema institucional “*Consagrar la Vida a la Búsqueda y Defensa de la Verdad*” no se fosilice junto a las rocas en las que fue grabado sin antes haber empujado a muchas mentes de las nuevas generaciones en el reto de construir sobre las huellas que van dejando en el vasto cosmos.

César A. Murga Moreno

Dedicatoria

Especialmente y con profunda devoción, a mi primogénito: Kenneth A. M. S.; sus vibras me reactivan cuando transito en declive.

A la memoria de Luis Ángel Moreno Rodríguez (1939 – 2024), quien en vida fue mi *Papalucho*. Me fortalece incalculablemente el hecho de pensar en él.

A mis padres y hermanas. En general, a mi familia Murga, Moreno, Blas, Fuentes y Yupanqui-Díaz que contribuyeron en diferentes niveles a lo que soy hoy en día.

César A. Murga Moreno

Agradecimiento

Al proyecto que me permitió surgir como tesista, titulado “*Markers of Triclabendazol Resistant Fascioliasis in the Highlands of Peru*” y que fue financiado por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (subvención N.º 1R01AI146353) desde el 2020 hasta el presente año. Mi gratitud al Dr. Miguel Cabada, afiliado a la Universidad de Texas y la Universidad Peruana Cayetano Heredia por su labor liderando tan importante investigación.

A mis asesores, amigos, mentores e investigadores, PhD. Pedro Ortiz y MCs. Cristian Hobán, quienes siempre me han acompañado y transmitido entusiasmo en los quehaceres científicos. Se comportaron todo el tiempo como familia poco después de que arribé a Cajamarca siendo un forastero cargado de planes y sueños.

A los investigadores, que también me han hecho beneficiario de su amistad, Dr. Marco Rivera, Dr. Juan de Dios Rojas, Dr. Severino Torrel y M.V. Luis Vargas, por todo el conocimiento que me imparten siempre, el apoyo, los consejos y los retos que me plantean para seguir desarrollándome y creciendo personal-profesionalmente.

A más amigos incondicionales que me brindó el Norte Peruano y propiciaron la culminación de mis estudios superiores: Félix Ríos, Yocsan Díaz, Hubert Gil, Martín Bustamante y Cristhian Bazán.

César A. Murga Moreno

Índice General

<i>Dedicatoria</i>	<i>v</i>
<i>Agradecimiento</i>	<i>vi</i>
<i>Índice General</i>	<i>vii</i>
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes de la investigación	4
1.2. Bases teóricas	7
1.3. Definición de términos básicos	35
MARCO METODOLÓGICO	37
2.1. Ubicación geográfica	37
2.2. Diseño de la investigación	38
2.3. Población, muestra y unidad de análisis	44
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de información	45
2.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información	46
2.6. Equipos y materiales	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1. Presentación de resultados	53
3.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados	64
CONCLUSIONES	68
SUGERENCIAS	70
REFERENCIAS	71
ANEXOS	88

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Lista de trematodos parásitos más comunes, órganos diana, enfermedades causadas y hospederos principales	10
Cuadro 2. Familias de genes candidatos de <i>F. hepatica</i> implicadas en la resistencia a TCBZ.....	25

Índice de Tablas

Tabla 1. Altitud y datos climatológicos del distrito de Cajamarca considerando los promedios anuales de cada parámetro en el 2024	38
Tabla 2. Fases de selección y distribución de grupos experimentales por lote de fasciolas de un hígado bovino.....	40
Tabla 3. Valores de viabilidad considerados en la evaluación y selección de fasciolas	41
Tabla 4. Valores de viabilidad por grupo de tratamiento que permitió declarar la susceptibilidad fenotípica al TCBZ.SO de las fasciolas en experimentación.....	46
Tabla 5. Número y frecuencia de lotes de fasciolas colectadas de hígados de bovinos en el Matadero Municipal de Cajamarca expuestas a algún grupo experimental, 2023	54
Tabla 6. Número de fasciolas colectadas de bovinos expuestas a TCBZ.SO clasificadas según fenotipo, 2023	55
Tabla 7. Clasificación fenotípica general de los lotes de <i>F. hepatica</i> colectados de bovinos tras 12 h o 24 h de exposición a TCBZ.SO in vitro, 2023	57
Tabla 8. Frecuencias y asociación con los meses del año de fenotipos de fasciolas susceptibles e indeterminadas colectadas de bovinos y expuestas a TCBZ.SO por 12 h, 2023	58
Tabla 9. Frecuencias y asociación con los meses del año de fenotipos de fasciolas resistentes e indeterminadas colectadas de bovinos y expuestas a TCBZ.SO por 24 h, 2023	60
Tabla 10. Coeficientes de correlación entre la clasificación fenotípica de fasciolas de bovinos expuestas a TCBZ.SO in vitro y los meses del año 2023.....	63

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Ciclo de vida de F. hepatica.</i>	15
Figura 2. <i>Área geográfica en la que se ejecutaron las fases de campo y laboratorio de la presente investigación</i>	37
Figura 3. <i>Distribución de un lote de fasciolas seleccionadas por su viabilidad y colocadas aleatoriamente en placas de cultivo celular con medio RPMI-anti + SFB al 5 %</i>	42
Figura 4. <i>Distribución de los grupos experimentales</i>	43
Figura 5. <i>Resumen de número de fasciolas recolectadas, seleccionadas por su viabilidad, expuestas a TCBZ.SO y declaradas en algún patrón fenotípico</i>	53
Figura 6. <i>Variación mensual general en la distribución de especímenes de F. hepatica de bovinos clasificados como susceptibles o resistentes, 2023</i>	62

Resumen

El trematodo *Fasciola hepatica* es un parásito zoonótico que afecta principalmente animales hervíboros destinados a la producción y accidentalmente a humanos en regiones altoandinas como Cajamarca, Perú. Su control depende casi exclusivamente del triclabendazol (TCBZ), cuya eficacia se encuentra comprometida por la aparición de aislamientos resistentes. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad en los patrones de susceptibilidad fenotípica al TCBZ sulfóxido (TCBZ.SO) en fasciolas colectadas de hígados bovinos en el Matadero Municipal de Cajamarca y expuestas *in vitro*. Durante el año 2023 se recolectaron parásitos adultos viables y se evaluaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y antibacteriano-antimicótico. Se expusieron a 15 µg/mL de TCBZ.SO por 12 h o 24 h, clasificando los fenotipos según su viabilidad expresada de cero a tres cruces. Se analizaron 1624 fasciolas distribuidas en 203 lotes experimentales. Los resultados mostraron un 13,36 ± 1,65 % de fenotipos susceptibles a TCBZ.SO, 2,52 ± 0,76 % resistentes y 84,11 ± 1,78 % indeterminados. La variación mensual fue significativa para los fenotipos susceptibles ($\chi^2 = 50,14$; $p < 0,001$), indeterminados expuestos 12 h ($\chi^2 = 25,00$; $p = 0,009$) y fenotipos resistentes ($\chi^2 = 23,83$; $p = 0,014$). Se observó que hacia los meses finales del año hay una disminución leve de susceptibles ($r_s = -0,11$; $p < 0,001$), mientras que la resistencia no mostró correlación con los meses ($r_s = -3,80$; $p > 0,05$). Estos hallazgos confirman la existencia de una población heterocigota de *F. hepatica* en Cajamarca, con respuestas variadas ante el TCBZ.SO, y pueden integrarse a las estrategias en el control del parásito en zonas ganaderas hiperendémicas.

Palabras clave: benzimidazol, Digenea, ensayo controlado, fascioliasis, resistencia parasitaria

Abstract

The trematode *Fasciola hepatica* is a zoonotic parasite that affects mainly herbivorous animals destined for production and accidentally humans in high Andean regions such as Cajamarca, Peru. Its control depends almost exclusively on triclabendazole (TCBZ), whose efficacy is compromised by the appearance of resistant isolates. The objective of this study was to determine the diversity in phenotypic susceptibility patterns to TCBZ sulfoxide (TCBZ.SO) in liver flukes collected from bovine livers at the Municipal Slaughterhouse of Cajamarca and exposed *in vitro*. During 2023, viable adult parasites were collected and evaluated in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum and antibacterial-antimycotic. They were exposed to 15 µg/mL TCBZ.SO for 12 h or 24 h, ranking the phenotypes according to their viability expressed from zero to three crosses. A total of 1624 liver flukes distributed in 203 experimental batches were analyzed. The results showed 13.36 ± 1.65 % TCBZ.SO susceptible phenotypes, 2.52 ± 0.76 % resistant and 84.11 ± 1.78 % indeterminate. Monthly variation was significant for susceptible ($\chi^2 = 50.14$; $p < 0.001$), indeterminate phenotypes exposed 12 h ($\chi^2 = 25.00$; $p = 0.009$) and resistant phenotypes ($\chi^2 = 23.83$; $p = 0.014$). It was observed that towards the final months of the year there is a slight decrease in susceptible phenotypes ($r_s = -0.11$; $p < 0.001$), while resistance showed no correlation with months ($r_s = -3.80$; $p > 0.05$). These findings confirm the existence of a heterozygous population of *F. hepatica* in Cajamarca, with varied responses to TCBZ.SO, and can be integrated into strategies for parasite control in hyperendemic livestock areas.

Keywords: benzimidazole, controlled trial, Digenea, fascioliasis, parasitic resistance

INTRODUCCIÓN

El trematodo *Fasciola hepatica* representa un problema recurrente en la salud pública y en los animales domésticos destinados a la producción, al ocasionar en Perú y gran parte del mundo, la enfermedad conocida como distomatosis o fascioliasis (1). La prevalencia de este helminto va desde el 30 % al 80 % en ganado bovino incluso en los países más desarrollados, ocasionando pérdidas en la producción de hasta mil litros de leche/vaca/año (2–4). Hace más de diez años en Perú, el perjuicio económico por fascioliasis en el sector pecuario, superaba los 50 millones de dólares americanos anualmente (5); mientras que, en Cajamarca se estima la pérdida anual solo por decomiso de vísceras en animales de abasto infectados con *F. hepatica* de 199 109,32 dólares americanos (6).

Esta parasitosis persiste por factores que propician la diseminación en las tierras altas como las lluvias y el sistema de riego tradicional (por gravedad o inundación), donde por precipitación o desborde ingresa la fuente de agua hacia los cultivos o terrenos en que se crían los animales de granja, se activan los hábitats de los hospederos intermediarios (caracoles limneidos) y se perpetúa así el ciclo biológico (7). Esto es importante, ya que la región Cajamarca se ubica en la zona andina norte de Perú y se reportó en el 2012 que tenía concentrado el 14 % (703 445 cabezas) de la población total de bovinos del país (8). También, porque en dos de los mataderos más importantes de la provincia de Cajamarca, se han reportado frecuencias de fascioliasis bovina del 80,6 % en el Matadero Municipal de Cajamarca y 77 % en el de Los Baños del Inca (9,10).

El TCBZ es el tratamiento predominante para el control de los estadios maduros e inmaduros del parásito, utilizado desde 1983 en medicina veterinaria y desde 1986 en el ámbito de la salud pública (11,12). Se estableció que una sola dosis es el tratamiento más adecuado para combatir la fascioliasis en animales y humanos en áreas con alta prevalencia (13,14). Desafortunadamente, su empleo indiscriminado y la comercialización de sustancias de baja calidad han resultado en el desarrollo de mecanismos de resistencia antihelmíntica (15,16). El fracaso terapéutico del TCBZ ha sido documentado en diversos países sudamericanos (17–22) y el mundo (23–25). En Cajamarca, se reportó una eficacia farmacológica de 30 % al aplicar la dosis única de 12 mg/kg de peso vivo en bovinos (26).

Se dispone de conocimientos limitados sobre los factores que favorecen la resistencia antihelmíntica en *F. hepatica*. Sin embargo, se postula que el sistema de detoxificación II mediado por la enzima Glutatios-S-Transferasa (GST) podría ser el responsable de este fenómeno en relación con los metabolitos de TCBZ (27). Adicionalmente, se han identificado algunas mutaciones nucleotídicas en el gen GST que podrían estar asociadas a los aislamientos resistentes y presentar una actividad distinta en función de su ubicación celular (mitocondria o citoplasma), corroborando de esta manera la presencia de más de una vía detoxificante de la enzima mencionada (28,29). Otro origen de la resistencia al TCBZ se identificó en Cusco, donde los aislamientos de bovinos presentaron diferencias en la transcripción de genes relacionados a la función de los microtúbulos, con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que permitieron conocer con una precisión ≥ 75 % de regiones genómicas altamente variables entre fasciolas sensibles y resistentes, sugiriendo una evolución independiente de la resistencia en el sur de Perú en comparación con otros países o continentes (30).

La investigación de los mecanismos de resistencia de *F. hepatica* podría permitir la predicción de fenómenos futuros similares al empleo de otros fármacos, así como las variaciones que podrían surgir al utilizar diferentes concentraciones de TCBZ con repeticiones en distintos periodos de tiempo. Para lograr esto, es imperativo implementar nuevos protocolos de diagnóstico rápido, preciso y rentable sobre las cepas presentes en poblaciones humanas y animales. Los cultivos y mantenimientos *in vitro* de formas juveniles o adultas de los trematodos proporcionan acceso a una serie de experimentos potenciales que permiten profundizar en la comprensión de los marcadores moleculares de resistencia, antígenos potenciales para la elaboración de vacunas y la exploración de nuevas dianas farmacológicas (31–33).

Objetivo general:

- Determinar la diversidad en los patrones de susceptibilidad fenotípica de fasciolas adultas aisladas de bovinos del Matadero Municipal de Cajamarca y expuestas *in vitro* a TCBZ sulfóxido (TCBZ.SO).

Objetivos específicos:

- Establecer el patrón de susceptibilidad fenotípica de fasciolas adultas expuestas a TCBZ.SO *in vitro*.
- Establecer el patrón de resistencia fenotípica de fasciolas adultas expuestas a TCBZ.SO *in vitro*.
- Establecer el patrón de fenotipos indeterminados de fasciolas adultas expuestas a TCBZ.SO *in vitro*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la investigación

1.1.1. Internacionales

La tecnología y conocimientos actuales permiten dar soporte vital *in vitro* a diferentes formas de helmintos que serán estudiados en diversos campos. Para el caso de *F. hepatica*, incluso se sugiere el trabajo con estadios juveniles provenientes del desenquistamiento de las metacercarias, trayendo como ventaja el hecho de no emplear modelos animales para obtener al parásito y realizar los experimentos deseados (34). Un medio de cultivo indicado para estadios juveniles o adultos de *F. hepatica* es el RPMI-1640 o NTCT-135, suplementado con penicilina/estreptomicina y suero sanguíneo; este sistema permite la experimentación adecuada con fármacos de interés (35–37). La administración de suero es bastante delicada dependiendo del fármaco, ya que algunos principios activos como la rafoxanida o el bitionol suelen unirse fuertemente a las proteínas del medio, disminuyendo su actividad *in vitro* en comparación con un medio sin suero (38). La presencia de bilis en el medio de incubación también influye en el patrón de captación de fármacos antihelmínticos, disminuyendo la actividad de principios como el TCBZ, fenbendazol y albendazol (39).

Dos aislamientos de *F. hepatica*: Oberon (Australia) y Fairhurst (Inglaterra) se enfrentaron *in vitro*. Los cultivos se realizaron a 37 °C en condiciones estériles empleando el medio NTCT-135 (adicionalmente con penicilina 50 UI/mL y

estreptomina 50 mg/mL). Luego se les renovó el medio de NTCT-135 pero esta vez con TCBZ.SO en concentraciones de 15 µg/mL o 50 µg/mL, teniendo una eficacia de 100 % a las 12 semanas postinfección en la cepa Fairhurst y de 5 % frente a la cepa Oberon con 4 semanas postinfección (40).

Se conoce que las concentraciones *in vitro* de 15 µg/mL de TCBZ, corresponden al 13,3 µg/mL descrito como la concentración plasmática máxima alcanzada *in vivo* en ovinos de Australia (41). También, en Estados Unidos se evidenció una buena efectividad de la droga en concentraciones *in vitro* de 2-5 µg/mL ante aislamientos susceptibles (42). En Irlanda del Norte se describió que la dosis de 50 µg/mL es la concentración más alta que se podría emplear *in vitro* y, aunque ciertamente es nociva para fasciolas susceptibles, permite identificar posibles aislamientos resistentes y evaluar los daños tisulares que podrían suscitarse (43–45).

También, a las primeras 12 h postexposición, las fasciolas susceptibles al TCBZ mantuvieron una concentración media de 0,051 mM en su entorno de cultivo, mientras que las fasciolas resistentes una concentración media de 0,082 mM (44). Esto es importante, ya que nos indica que el metabolismo de las fasciolas resistentes se puede alterar y propiciar una mayor detoxificación o menor absorción de la molécula, por ende, sobreviven *in vitro* a exposiciones más prolongadas con TCBZ en dosis cuatro veces más elevadas de lo normal (43).

Otro experimento *in vitro* en Suiza, recuperó fasciolas del conducto biliar central de ratones infectados artificialmente, luego, los parásitos se cultivaron individualmente en placas de 12 pocillos que contenían cada una 3 mL de RPMI-

1640 + antibacteriano 1 % (50 µg/mL de estreptomicina y 50 µg/mL de penicilina) y 80 µg/mL de hemina; para los experimentos en días posteriores se adicionó TCBZ, TCBZ.SO y TCBZ sulfona (TCBZ.SO₂) a dosis de 15 µg/mL cada uno. Las puntuaciones de efectividad de los fármacos y sus sinergias se realizaron en base a la motilidad de las fasciolas en los días posteriores; así, se determinó un mayor efecto *in vitro* de TCBZ.SO (46). Estos sistemas de mantención *in vitro* de *F. hepatica* “puestos a punto”, además de permitir experimentar con fármacos y poder tener muestras viables para las técnicas de biología molecular, facilitan también la observación con microscopía óptica convencional y electrónica de los daños tegumentarios o alteraciones en distintos tejidos y aparatos del parásito (47).

1.1.2. Nacionales

En el año 2012 se realizó la caracterización fenotípica de *F. hepatica* en base a la morfología y morfometría presentadas en especímenes del valle (Cajamarca y Mantaro, Perú) y altiplano (Altiplano Norte, Bolivia); los resultados reportaron que no existe relación entre la diferencia altitudinal o el origen geográfico, únicamente en el Altiplano se demostró que la gravidez del útero se alcanza a una talla más pequeña que en las fasciolas del valle (48). En Cajamarca y Cusco se expusieron 3348 parásitos totalmente móviles a condiciones de susceptibilidad y resistencia al TCBZ, de las que 341 (21,8 %) fueron clasificados como susceptibles y 462 (25,9 %) como resistentes; la mayor cantidad de fasciolas resistentes se describieron en Cusco ($p < 0,001$) y hubo diferencia significativa asociada a la longitud de los trematodos ($p = 0,016$) y el mes del año de la colección ($p = 0,008$) con la presentación de los fenotipos descritos (49).

Concerniente a la resistencia antihelmíntica en Perú, se ha reportado que *F. hepatica* hace una década no responde satisfactoriamente a los tratamientos con TCBZ. En el año 2012, se describió una eficacia terapéutica para fascioliasis bovina en Jauja de la siguiente manera: día 7 postratamiento (53,4 %), día 14 (53,3 %), día 21 (36,4 %) y en el día 28 (34,9 %); notando una lenta y mínima disminución en la prueba de recuento de huevos y reportando aislamientos resistentes al TCBZ (50). Una eficacia del 25,2 % de TCBZ en casos de fascioliasis en ganado lechero, se constituye en el primer reporte formal de fallo terapéutico y, por ende, resistencia antihelmíntica en Cajamarca (26).

Acertar en el diagnóstico y vigilar las poblaciones de trematodos resistentes, son metas fundamentales que permitirán controlar eficazmente este problema, así, se informarán las opciones reales de tratamiento y también se probará la eficacia de nuevos fármacos (51). Ante esto, es importante el establecimiento de novedosos y rápidos protocolos estandarizados para diagnosticar susceptibilidad o resistencia en áreas de interés geográficas, donde *F. hepatica* es emergente.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Descripción general de los platelmintos

El Phylum Platyhelminthes (comúnmente denominado platelmintos) es un amplio grupo de invertebrados de cuerpo blando, no segmentados, aplanados dorsoventral y bilateralmente. Estos gusanos carecen de celoma (cavidad corporal), esqueleto o ano, y no poseen sistemas respiratorio y circulatorio específicos. Sin embargo, tienen un intestino ciego que permite la entrada y salida de alimentos, mientras que los nutrientes y el oxígeno atraviesan su

cuerpo por difusión (52). Los platelmintos se clasifican a grandes rasgos como parásitos o no parásitos. Existen tres grupos principalmente parasitarios en el Phylum: los Monogenea (predominantemente ectoparásitos y no requieren hospederos intermediarios), los Cestoda, y los Trematoda; estos últimos dos grupos son endoparásitos, más complejos y poseen dos o tres hospederos, incluyendo un hospedero vertebrado en su ciclo de vida (53). Se han descrito más de 22 500 especies de platelmintos en todo el mundo (54), la mayoría de las cuales presentan diversas formas de reproducción. Sin embargo, predomina el hermafroditismo, en cuyo caso cada individuo posee un sistema reproductor masculino y femenino totalmente complementarios (55). El Phylum Turbellaria se considera generalmente como platelminto no parásito, gusanos planos de “vida libre” (o planarias). La mayoría de las planarias viven en agua dulce, tienen cuerpos alargados en forma de hoja y son ciliados. Tienen simetría bilateral, carecen de celoma y ano, y son hermafroditas (56). Un ejemplo es *Schmidtea mediterranea*, un organismo modelo comúnmente utilizado para investigar la especificación epigenética de las células germinales, debido a su rápida capacidad regenerativa (57).

1.2.2. Trematodos

Los Trematodos son gusanos planos conocidos comúnmente como duelas (Cuadro 1). Su tubo digestivo incompleto comienza en la ventosa oral y termina en un intestino ciego. No tienen ano, por lo que los desechos son regurgitados tras la digestión, mientras que los desechos líquidos salen al exterior a través de células excretoras especializadas. Estructuralmente tienen un tegumento protector (por ejemplo, ante fármacos, enzimas digestivas y de la inmunidad

del hospedero), ayuda a la absorción de nutrientes y al intercambio gaseoso (58,59). Un trematodo posee un sistema reproductor masculino y otro femenino en el mismo individuo (60). Por lo tanto, puede producirse autofecundación (esto es común en *F. hepatica*, *F. gigantica*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciolopsis buski*), o fecundación cruzada entre dos individuos (como en *Paragonimus westermani*). Sin embargo, las especies de esquistosomas son dioicas, es decir, tienen sexos separados (58).

Generalmente, las duelas tienen un ciclo de vida complejo que incluye al menos dos hospederos, un molusco hospedero intermedio (como los caracoles) donde se produce la reproducción asexual, y un hospedero definitivo, típicamente un vertebrado, donde se produce la reproducción sexual (61), aunque la presencia de más de un hospedero intermediario es común en las duelas (62). En hermafroditas como *Fasciola* spp., la madurez sexual masculina se logra antes que la femenina, mientras que las tasas de desarrollo están enormemente influenciadas por la temperatura (63). Los adultos de *F. gigantica* miden aproximadamente 7,5 cm por 1,5 cm, *F. hepatica* mide aproximadamente 3,5 cm por 1,5 cm, *P. westermani* mide aproximadamente 1 cm por 0,5 cm, *Paramphistomum gracile* mide aproximadamente 15 mm por 7 mm, mientras que *Heterophyes heterophyes* es de aproximadamente 1,7 mm por 0,4 mm (58,64).

Los trematodos incluyen duelas del hígado (las más comunes son *F. hepatica*, *F. gigantica*, *C. sinensis* *Fascioloides magna*, y *Opisthorchis* spp.), que causan enfermedades con alta especificidad a este órgano. Duelas de la sangre, estas invaden el sistema circulatorio. Duelas intestinales (las más comunes son *F.*

buski, *Echinostoma* spp. y *Paramphistomum cervi*), que atacan el tracto gastrointestinal. Duelas pulmonares (como *P. westermani*), que atacan los órganos respiratorios (65).

Cuadro 1. Lista de trematodos parásitos más comunes, órganos diana, enfermedades causadas y hospederos principales

Trematodo	Órgano diana	Enfermedad causada	Hospederos comunes
<i>F. hepatica</i>	Hígado	Fascioliasis	Rumiantes, humanos
<i>F. gigantica</i>	Hígado	Fascioliasis	Rumiantes, humanos
<i>Fasciolopsis buski</i>	Intestino delgado	Fasciolopsis	Humanos, cerdos
<i>Fascioloides magna</i>	Hígado	Fascioloidosis	Rumiantes
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Hígado	Dicrocelosis	Rumiantes, humanos, cerdos, conejos
<i>Clonorchis sinensis</i>	Hígado	Clonorquiasis	Humanos
<i>Schistosoma mansoni</i>	Venas mesentéricas	Esquistosomiasis	Humanos
<i>S. japonicum</i>	Venas del intestino delgado, hígado	Esquistosomiasis	Humanos
<i>S. haematobium</i>	Venas de la vejiga urinaria	Esquistosomiasis	Humanos
<i>Paragonimus westermani</i>	Pulmón	Paragonimiasis	Humanos
<i>Heterophyes heterophyes</i>	Intestino delgado	Heterofiosis	Humanos, perro, gato.
<i>Echinostoma</i> spp.	Tracto gastrointestinal	Equinostomiasis	Humanos, roedores, pájaros, carnívoros
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Hígado	Opistorquiasis	Humanos, gatos, perros
<i>Paramphistomun</i> , <i>Calicophoron</i> y <i>Cotylophoron</i> spp.	Rumen	Paramfistomosis	Rumiantes

1.2.3. Trematodos hepáticos

Los trematodos parásitos, como los trematodos del hígado, son muy importantes para una amplia gama de mamíferos. Los hospederos definitivos incluyen humanos, ganado, roedores, etc., con parásitos que causan diferentes niveles de infección en estos hospederos. Las infecciones están distribuidas en todo el mundo. Los trematodos hepáticos de gran importancia económica y distribución mundial incluyen *F. hepatica* y *F. gigantica*; estos causan fascioliasis (sinónimo fasciolosis) en el ganado, fauna silvestre y los humanos (66). La *F. hepatica*, por ejemplo, es bien conocida por su alto impacto económico veterinario, potencial zoonótico y está clasificada como una enfermedad tropical desatendida por la Organización Mundial de la Salud (67). Curiosamente, la *Fasciola* fue identificada en 1547 en hígados de ovejas y cabras; Jean de Brie mencionó a la *Fasciola* en 1379, mientras que su primer registro en un humano fue en 1760 (68).

La *F. hepatica* parece predominar en zonas templadas, mientras que la *F. gigantica* en zonas más cálidas. Incluso, puede existir coinfección entre ambas especies (69–71), y con otros helmintos u organismos bacterianos (como *Mycobacterium bovis*, el agente causante de la tuberculosis bovina). Las coinfecciones tienen un papel importante en las capacidades inmunomoduladoras del hospedero de *Fasciola*, lo que genera mayores riesgos en el ganado (72,73).

Morfológicamente, *F. hepatica* y *F. gigantica* son bastante similares, tienen ciclos de vida similares que involucran caracoles limneidos y principalmente a los rumiantes como hospederos definitivos primarios. La única diferencia clave está en el hospedero intermediario; mientras que *F. hepatica* infecta a *Galba truncatula*, *F. gigantica* infecta a *Radix natalensis* y *R. rubiginosa*, aunque la preferencia se debe en gran medida a la distribución de estos hospederos intermediarios. *G. truncatula* es común en regiones templadas mientras que *R. rubiginosa* y *R. natalensis* son predominantes en las zonas tropicales (74,75).

1.2.4. Importancia económica de los trematodos hepáticos

La infección por duelas hepáticas (predominantemente *F. hepatica*) tiene un gran impacto en la producción ganadera, aunque las estimaciones exactas son difíciles de evaluar (76). En el ganado, la enfermedad se ha asociado con una disminución en la producción de leche, con pérdidas de hasta 2 kg por día y una enfermedad marcada en terneros destetados (77). La infección también causa una mala calidad de la canal en el ganado. En países endémicos Europa se informa una tasa de rechazo del 30 % de los hígados de ganado bovino (76). En Escocia, por ejemplo, los datos del matadero revelaron que los animales sacrificados entre 2005 y 2015 con antecedentes de infección por duelas hepáticas tenían un peso en frío más bajo, un precio más bajo, puntuaciones de conformidad de la canal más bajas, niveles de grasa reducidos y una caída general en el valor de la canal, lo que afecta negativamente el sustento de los ganaderos (78). Se estima que la pérdida económica mundial de al menos 3,2 mil millones de dólares americanos anuales está asociada con la enfermedad (74), con más de 600 millones de animales afectados por el parásito (79).

La infección por duelas del hígado es posiblemente la enfermedad parasitaria más importante entre el ganado de pastoreo; desafortunadamente, la mayoría de las infecciones son inaparentes, por lo que las pérdidas de producción son casi inevitables. Las pérdidas en las ovejas pueden ocurrir entre diez y doce semanas después de la infección inicial (coincidiendo con la baja o nula detección de huevos en las heces), lo que dificulta el manejo (80,81). A nivel general, las ovejas están muy predispuestas a las infecciones agudas, en cuyo caso la ingestión de muchas metacercarias, principalmente a principios de otoño, conduce a trematodos juveniles perforadores de tejidos migratorios, mientras que el ganado bovino sufre predominantemente fascioliasis crónica debido a duelas adultas (76). La fascioliasis puede ocasionar daño hepático y muerte súbita de las ovejas infectadas (82). Las infecciones agudas afectan negativamente el bienestar y la rentabilidad de los animales, sin embargo, la evaluación precisa del impacto negativo es un desafío debido a los registros e informes deficientes en las granjas (76). Existe una falta de herramientas específicas para evaluar estos impactos económicos a nivel de granja para facilitar la toma de decisiones apropiadas por parte de los ganaderos y el gobierno (83).

1.2.5. Ciclo de vida de *F. hepatica*

Comprende ocho fases clave: huevo, miracidio, esporocisto, redia, cercaria, metacercaria, fasciola juvenil y adulta. El ciclo de vida está influenciado en gran medida por la temperatura y la humedad, que afectan la propagación de los caracoles. El clima favorable (veranos húmedos e inviernos suaves) facilita el aumento del hospedero intermediario y de los trematodos (76).

El ciclo de vida de los trematodos está bien estudiado y descrito (Figura 1). Los trematodos adultos viven en los conductos biliares del hospedero, donde ponen huevos que se eliminan junto a las heces. Los huevos embrionan en el agua y eclosionan para producir miracidios. Estos miracidios son móviles, por lo que la presencia de condiciones húmedas favorece la búsqueda del caracol hospedero intermediario (*Galba truncatula*). En el caracol, hay una expansión clonal del parásito desde el esporocisto a las redias y, finalmente, a las cercarias. Se ha demostrado que los caracoles liberan cercarias hasta los cuatro meses, aunque la excreción alcanza su punto máximo en las primeras cuatro semanas (84).

Las cercarias tienen colas, que les permiten moverse en un entorno acuático hasta que encuentran vegetación, después de lo cual pierden su cola y se enquistan dando origen a las metacercarias, la forma infecciosa. La ingestión de pasto fresco con metacercarias viables aumenta la gravedad de la enfermedad. Tras la ingestión por un hospedero definitivo (normalmente rumiantes u ocasionalmente humanos), el parásito se desenquista en el duodeno, penetra en el intestino delgado y migra hacia el hígado. Estos juveniles recién exquistados causan daño tisular a medida que viajan y pueden interactuar con el hospedero a través de su tegumento. El glicocálix en su tegumento (que se desprende a medida que maduran y se convierten en adultos) es un mecanismo de defensa que utiliza el parásito para evitar que las células inmunitarias del hospedero se unan a él (85). Finalmente, llegan a los conductos biliares, donde maduran, aunque ocasionalmente se producen trematodos ectópicos, que pueden infectar otros tejidos, como los pulmones.

Los trematodos adultos pueden vivir en el conducto biliar de los hospederos no tratados durante años, lo que provoca un estado de enfermedad crónica, especialmente en el ganado bovino (80).

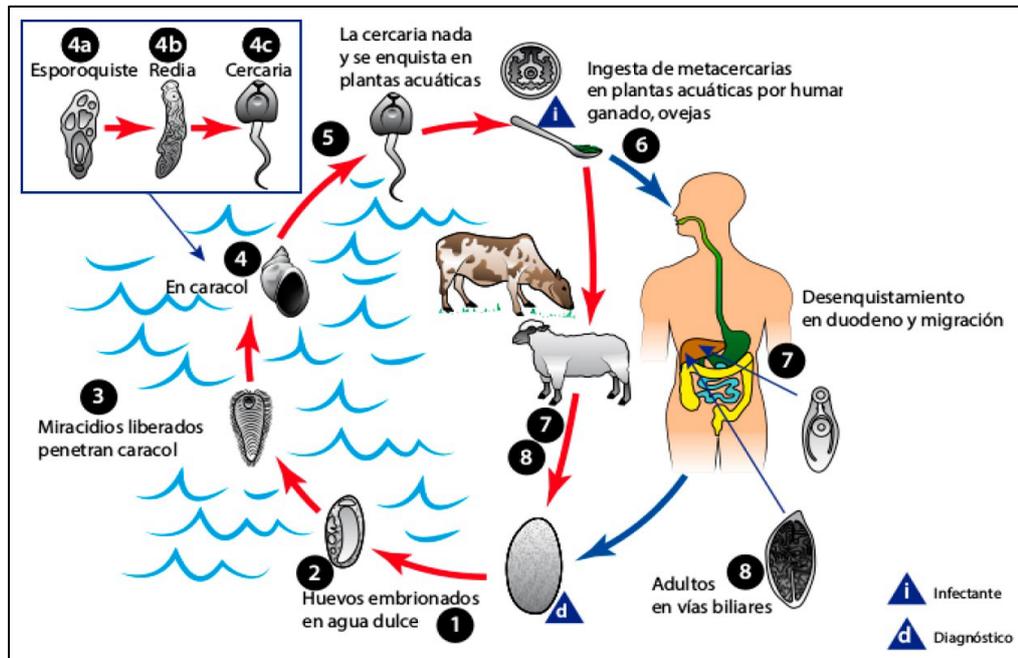


Figura 1. Ciclo de vida de *F. hepatica*. Los huevos de la *F. hepatica* pasan a las heces “1”, embrionan en el agua “2” y eclosionan en miracidios “3” que luego infectan al hospedero intermediario (*Galba truncatula*) “4”. En el caracol, el desarrollo ocurre desde los esporocistos “4a”, a las redias “4b”, luego a las cercarias “4c”; estas son liberadas del caracol “5”, y posteriormente se enquistan en la vegetación como metacercarias – la etapa infectiva “6”. Las metacercarias son ingeridas por el hospedero definitivo “7”, el parásito se enquista y estos juveniles migran a través del intestino delgado hacia el hígado, y finalmente madura en los conductos biliares “8” (86)

1.2.6. Diagnóstico y desafíos asociados

En el diagnóstico de la fascioliasis son importantes algunos factores como el diagnóstico temprano para facilitar el tratamiento oportuno, la precisión de la técnica de detección (sensibilidad y especificidad), la relación costo-beneficio,

el tiempo para obtener los resultados, el personal necesario, la capacidad de identificar las etapas de la infección y la facilidad de acceso a las pruebas. Es importante señalar que cada técnica diagnóstica tiene sus desventajas.

Generalmente, el diagnóstico se realiza mediante el recuento de huevos fecales (FEC, por las siglas en inglés de Fecal Egg Count), sin embargo, esto solo es beneficioso aproximadamente ocho semanas después de la infección debido al período de prepatencia (83). Los recuentos son un desafío cuando hay niveles bajos de huevos y puede requerir exámenes repetidos. Sin embargo, el FEC es relativamente barato y útil. El FEC no es confiable en infecciones pospatentes, ya que la eliminación de huevos se reduce en este tipo de infección debido a la baja carga de huevos, envejecimiento de las mismas o la propia muerte (87), y esta técnica solo detecta infecciones patentes (los huevos se pueden detectar debido a la alta carga en el hospedero o el pico reproductivo del parásito, en el que se eliminan de 10 a 20 mil huevos por día) (88).

Otras técnicas incluyen microscopía cuantitativa (como Kato-Katz), la flotación coprológica (como FLOTAC) y sedimentación como la de Dennis *et al.* o Rojas-Moncada *et al.* (89–91); estas requieren menos capacitación, son técnicas de rutina y sensibles. Sin embargo, pueden ser costosas y escasas cuando se necesitan pruebas masivas (87,92,93). Se ha informado del uso de enfoques de diagnóstico por imágenes en humanos. Por ejemplo, se ha utilizado la tomografía computarizada y endoscopia ultrasonográfica para identificar un absceso en un hígado infectado por *F. hepatica* (94,95), pero su uso en la ganadería no es realista. El diagnóstico también es posible mediante un examen físico en la necropsia, para identificar trematodos adultos en algunos órganos.

En los últimos años se utilizan técnicas inmunológicas y moleculares, estas requieren de un mayor nivel de capacitación del personal. La investigación sobre varios tipos de técnicas de inmunodiagnóstico es extensa (66); sin embargo, generalmente se prefiere el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los enfoques de inmunodiagnóstico se basan en el análisis de antígenos de *Fasciola* (como antígenos de excreción/secreción, cisteína proteasas, antígenos somáticos, antígenos del tegumento, etc. que circulan en la sangre, la bilis y las heces) y anticuerpos estimulados en los hospederos, como la IgG específica del parásito en suero. Un desafío importante con las pruebas de anticuerpos es la reactividad cruzada. Sin embargo, los métodos moleculares son altamente específicos y sensibles, capaces de identificar la infección patente y son cada vez más asequibles, aunque todavía carecen de protocolos estandarizados en todos los laboratorios, lo que reduce su reproducibilidad. Los métodos son generalmente inaccesibles para un ganadero promedio, especialmente donde hay acceso limitado a laboratorios que brindan estos servicios (83).

1.2.7. Abordaje de la fascioliasis

A menudo se utiliza una combinación de varias medidas estructuradas para controlar y prevenir adecuadamente las infecciones por duelas del hígado. Estas a menudo incluyen métodos no terapéuticos y terapéuticos. Los primeros consideran el manejo del pastoreo, lo que implica garantizar que no se pastoree en terrenos muy contaminados y la rotación de las áreas de pastoreo para romper el ciclo de vida del parásito. Otras medidas incluyen prácticas agrícolas como mejoras en la bioseguridad, cuarentena de animales introducidos en la

granja, pruebas adecuadas y aislamiento de animales. Se ha sugerido el control del hospedero intermediario, aunque esto es bastante difícil de lograr (82).

El enfoque terapéutico implica el uso eficaz de trematocidas, ya sea de manera profiláctica o en infecciones activas. Si bien hay muchos trematocidas en uso, los desafíos varían desde la cobertura variable del tratamiento, los altos niveles de reinfecciones y la efectividad variable de estos medicamentos (96). La efectividad de los medicamentos varía con respecto al tipo de medicamento (o combinación de medicamentos) utilizado y la etapa del parásito al que se dirige. A pesar de la creciente investigación centrada en comprender la patogénesis y el manejo de la enfermedad, los informes indican un aumento en la prevalencia de la enfermedad en los últimos tiempos (97). Un desafío creciente para controlar la enfermedad es la resistencia al TCBZ, el único medicamento que ha demostrado matar a los trematodos hepáticos adultos e inmaduros (98).

La creciente incidencia de la resistencia a los medicamentos supone una gran amenaza para la producción ganadera en todo el mundo y su control en humanos (13,51). La resistencia a los medicamentos se atribuye principalmente a la dependencia excesiva de TCBZ, los hallazgos indican que el parásito puede evolucionar rápidamente (99). Por lo tanto, los cambios evolutivos en el parásito también podrían desempeñar un papel clave en la resistencia a los medicamentos (100). Así, la investigación en la última década se ha centrado en encontrar medidas alternativas efectivas para controlar el parásito.

1.2.8. Trematocidas y su uso en el control de *F. hepatica*

El manejo de las infecciones por duelas mediante agentes químicos es generalmente aceptado en las granjas, aunque el uso de estos diversos medicamentos presenta algunas limitaciones. Dependiendo de varios factores, como la etapa del parásito al que se dirige, la especie hospedera, la fase de la infección y la disponibilidad, se utilizan estratégicamente los trematocidas o una combinación de estos medicamentos. Los medicamentos utilizados incluyen TCBZ, albendazol, ricobendazol, nitroxinil, closantel y clorsulón . TCBZ es el único medicamento capaz de matar a los parásitos juveniles; con hasta un 92 – 98 % de efectividad contra los juveniles de una semana y un 100 % de efectividad contra los juveniles de seis semanas (98). Es importante poder matar a los juveniles porque, después del exquistamiento en el duodeno, su movimiento migratorio a través de los intestinos y el hígado hasta el conducto biliar daña los tejidos del hospedero y causa una infección aguda (85). Además, es importante matar a los trematodos adultos porque sus espinas duras en la superficie del tegumento externo dañan la vasculatura del hospedero durante la alimentación, provocando daños tisulares adicionales (101).

La creciente prevalencia de resistencia al TCBZ ha suscitado serias preocupaciones entre los ganaderos. Se ha documentado resistencia al TCBZ alrededor del mundo en animales de abasto, algunos otros fueron en humanos (13,51). Los informes de resistencia en humanos resaltan aun más las preocupaciones zoonóticas, particularmente en países con alta incidencia. Aunque la resistencia a TCBZ está muy extendida, se han reportado pocos casos de resistencia a otros trematocidas como closantel (102), nitroxinil (103),

clorsulón (104) y albendazol (105). Sin embargo, los informes de campo indican un predominio de la resistencia a TCBZ en *F. hepatica*, especialmente en ovejas, y en gran medida en bovinos (51). Esto ha llevado al uso de varias combinaciones de fármacos para obtener resultados efectivos (80).

Las combinaciones de fármacos para el control de los trematodos hepáticos se utilizan con frecuencia, aunque la eficacia puede verse reducida en algunos casos. No hay datos científicos suficientes para validar el uso de combinaciones de fármacos para el control de los trematodos hepáticos (76). Las combinaciones varían en su forma, algunas se administran por vía oral, otras son inyectables; estas variaciones plantean una forma de limitación a su uso. Otros factores a tener en cuenta en las combinaciones de fármacos incluyen el margen de seguridad individualmente y cuando se combinan, la disponibilidad y la resistencia. En los últimos tiempos ha habido informes de resistencia a algunas de estas combinaciones de fármacos también repartidos por todos los continentes (51). Sin embargo, la resistencia a TCBZ es de interés predominantemente debido a la excesiva dependencia del fármaco. Esto es comprensible teniendo en cuenta el éxito atribuido al fármaco en el control de *Fasciola* spp.

Más allá de la selección de la elección adecuada del fármaco (o combinación de fármacos) según la etapa de la infección a la que se dirija, los veterinarios recomiendan a los ganaderos que consideren la dosificación correcta de los medicamentos para evitar el fracaso del tratamiento, la rotación de moléculas de diferentes grupos químicos, la sincronización estratégica del tratamiento con respecto al clima, y la realización de pruebas repetidas en animales. Los

fármacos cuando se utilizan adecuadamente, pueden reducir el desarrollo de resistencia a los medicamentos (106). Actualmente, la comunidad científica se ha centrado sobre la comprensión del mecanismo de resistencia a los medicamentos con el objetivo de controlar el parásito.

1.2.9. Mecanismo de acción de los fármacos y resistencia

El modo de acción del TCBZ es complejo en el parásito y en el hospedero, por lo que determinar el mecanismo de acción del TCBZ es un desafío. Esto se debe a que actualmente se han identificado al menos tres mecanismos de acción del TCBZ (51). El TCBZ es un derivado del benzimidazol, que se cree que es ingerido por las duelas o absorbido por difusión a través del sincitio tegumental. Anteriormente se creía que el fármaco se unía a las tubulinas (en particular, a las β -tubulinas) basándose en los efectos del fármaco, como la integridad morfológica del parásito, los procesos de alimentación y digestión (107). La evidencia indica que la administración de TCBZ causa daño y pérdida del tegumento del parásito, pérdida de la capacidad de inmunotinción en el sincitio del tegumento y alteración de la mitosis en las células vitelinas y espermatogénicas (108). Sin embargo, la unión de TCBZ a las β -tubulinas es cuestionable porque en los nematodos, la resistencia al benzimidazol está asociada con mutaciones F200Y/E198A o F167Y en las β -tubulinas y este no es el caso en los trematodos del hígado (109). A pesar del uso extensivo de TCBZ, su modo de acción aún elude a los investigadores, lo que hace más complicado comprender cómo los trematodos desarrollan resistencia.

Actualmente se han identificado genes que juegan un papel en el mecanismo de acción y potencialmente en la resistencia al TCBZ. Estos hallazgos, algunos de los cuales influyen en los sistemas biológicos del parásito, ya sea directa o indirectamente, están cambiando la forma en que vemos la acción del TCBZ, la resistencia y la posible identificación de nuevos objetivos farmacológicos. Los genes investigados incluyen adenilato ciclasa (AC), Ras, tubulinas, enzima citocromo P450, Glicoproteína-P (PGP, por sus siglas en inglés), glutatión S-transferasa (GST) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, por sus siglas en inglés) (Cuadro 2) (110–113). Por ejemplo, se ha descubierto que el TCBZ inhibe la actividad de la AC y/o inhibe la relación entre Ras y la actividad de la AC, lo que lleva a la activación de la respuesta relacionada con el estrés (114). Esto se vuelve relevante porque la vía de la proteína quinasa A (PKA) Ras-AC (un sistema sensorial de nutrientes diseñado para regular el metabolismo, la división celular, la respuesta al estrés, etc.), cuando se inactiva aumenta la resistencia a un factor de estrés (114); en este caso el fármaco, TCBZ.

Estudios posteriores en aislados susceptibles y resistentes a TCBZ de *F. hepatica* indican que la actividad de AC se reduce en aislados resistentes a TCBZ (110), destacando así cómo TCBZ afecta la función de AC a través de las vías de cAMP.

Existe un creciente interés en el papel de varios procesos metabólicos en la acción de TCBZ. La actividad de PGP, las vías de la flavina mono-oxigenasa y la enzima citocromo se han implicado recientemente en la resistencia a TCBZ. Los hallazgos indican que los inhibidores de PGP como la ivermectina

y el R (+)-verapamilo afectan la captación y la actividad de TCBZ tanto en aislados susceptibles como resistentes, con una captación del fármaco disminuida en duelas susceptibles a TCBZ, mientras que la resistencia se revirtió en presencia de R (+)-verapamilo. Los inhibidores de PGP, flavina mono-oxigenasas (FMO) como el metimazol y citocromo P450 como el ketoconazol, inician un mayor daño del tegumento en duelas resistentes a TCBZ, aunque se cree que el sistema enzimático FMO es un sistema más importante en el metabolismo de TCBZ en comparación con el citocromo P450 (51,110,115–117). De manera similar, las FABP también se han implicado en la biología de las duelas del hígado. Las FABP recombinantes (como Fh12 y Fh15) se han identificado como posibles candidatos a vacunas y se ha demostrado que brindan protección contra la infección por *F. hepatica* (118–120). Las FABP se localizan en el tegumento y desempeñan un papel clave como transportadores de lípidos, conduciéndolos dentro del parásito (119). Los hallazgos indican que la actividad de las FABP aumenta significativamente en los trematodos hepáticos adultos resistentes a TCBZ y se ha asociado con la unión del fármaco praziquantel en el trematodo *Schistosoma japonicum*. Por lo tanto, las FABP son importantes para el secuestro de fármacos; sin embargo, a pesar de la creciente evidencia que respalda la importancia de las FABP en la biología de *F. hepatica*, el conocimiento de este pequeño grupo de genes es escaso (113).

Otro grupo de genes bien estudiado son las glutatión-S-transferasas (GSTs). Estos juegan un papel importante en la desintoxicación de fase II en parásitos, particularmente la desintoxicación de xenobióticos, la unión de ligandos y el

transporte, con duelas resistentes a TCBZ que exhiben significativamente niveles más altos de expresión de GSTs en comparación con clones susceptibles a TCBZ (29). Esto ha llevado a creer que la conjugación de los metabolitos de TCBZ a GST están involucrados en la resistencia a TCBZ a través de la alteración de su metabolismo (51).

La comprensión de la resistencia a TCBZ se ha centrado principalmente en tres áreas (Cuadro 2). Esto incluye la unión de la tubulina, la absorción y el metabolismo de fármacos alterados (51); en particular, la investigación de familias de genes de interés que desempeñan funciones importantes en la biología de *F. hepatica* y acción del TCBZ (30). Comprender el mecanismo de resistencia del TCBZ podría facilitar la comprensión de cómo responde el parásito a la exposición al TCBZ y otros antihelmínticos. Una mejor comprensión de la respuesta del parásito a varios antihelmínticos podría permitir comprender las opciones de combinación de medicamentos y los fracasos de las vacunas. Esto podría ayudar potencialmente a la identificación de nuevos fármacos, combinaciones de fármacos y al desarrollo de vacunas que sean más eficaces. Identificar el mecanismo de TCBZ es un desafío, ya que no está claro si la resistencia se debe a múltiples vías de interacción conjunta o a una única vía.

Cuadro 2. Familias de genes candidatos de *F. hepatica* implicadas en la resistencia a TCBZ

Mecanismo de acción de los fármacos	Familia de genes	Referencias
Unión de tubulina alterada	Tubulinas	(30,43,45,107,112)
Absorción alterada de fármacos	Transportadores de casetes de unión a ATP (ABCs)	(115,116)
	Adenilato ciclasa (ACs)	(110)
	Ras	(114)
	ADP Factores de ribosilación	(121)
Mecanismo alterado de fármacos	Citocromo P450 (CYP450)	(117)
	Glutación-S-transferasas (GSTs)	(29,122–124)
	Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)	(119)

1.2.10. Perspectivas de desarrollo de vacunas

El esfuerzo por identificar una vacuna para el control de la fascioliasis data de hace tres décadas, pero el consenso es que nunca se ha alcanzado el nivel de eficacia para la producción comercial. Esto se debe a que ninguna vacuna, ya sea un solo antígeno o una combinación, ha producido resultados lo suficientemente confiables como para superar la actividad inmunomoduladora de los trematodos hepáticos, que limita el desarrollo de inmunidad protectora en animales infectados (125–127). El principal desafío es el hecho de que hay precisiones en cómo los trematodos hepáticos invaden y migran dentro del hospedero y controlan rápidamente las respuestas inmunitarias. Entre cuatro y seis días después de la infección, los juveniles recién exquistados (NEJs) de *Fasciola* llegan al hígado y causan un daño evidente en el parénquima hepático,

mientras que el inicio de la actividad inmunitaria podría ser tan temprano como veinticuatro horas después de la infección artificial en condiciones experimentales (127).

Las investigaciones sugieren que la falta de desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora de tipo 1 de las células T colaboradoras en los hospederos infectados experimental y naturalmente por duelas, en favor de una fuerte respuesta inmunitaria reguladora de tipo 2 (a medida que la infección avanza hacia la cronicidad) que reprime el tipo 1, es la razón por la que las vacunas contra *F. hepatica* no han sido efectivas (126). Por lo tanto, una vacuna está diseñada para poder iniciar la respuesta protectora de tipo 1. A pesar de estos desafíos, se ha hecho un gran esfuerzo centrado en identificar objetivos de vacunas, evaluar la eficacia, la reproducibilidad, aumentar los porcentajes de protección utilizando adyuvantes, reducir la carga de duelas, etc. Estos han identificado en gran medida antígenos importantes en la biología de las duelas, genes ortólogos que se han identificado en especies estrechamente relacionadas como antígenos de interés y antígenos que reaccionan de forma cruzada con sueros de otros trematodos (128). Por ejemplo, genes como GST, FABP y catepsinas se han estudiado ampliamente como candidatos a vacunas en duelas del hígado (en particular *Fasciola* spp., *C. sinensis* y *Opisthorchis* spp.) y duelas de la sangre (en particular *Schistosoma* spp.), sin embargo, el nivel variable de resultados observados podría deberse a variaciones genéticas en el hospedero y/o variaciones en la homología de las secuencias de estos ortólogos (96).

Aunque actualmente no existen vacunas disponibles comercialmente contra los trematodos hepáticos, el uso creciente de diversos enfoques multiómicos en la investigación sobre helmintos podría ser fundamental para desarrollar una vacuna eficaz contra las enfermedades causadas por helmintos (129). Si bien la eficacia ante las nuevas dianas de la vacuna contra *Fasciola* investigados anteriormente, ha producido diferentes niveles de protección (128), el éxito en otros helmintos también ha sido generalmente limitado (130).

A pesar de estos desafíos, hay tres vacunas disponibles comercialmente contra helmintos. La vacuna Barbervax se desarrolló contra el nematodo *Haemonchus contortus*. La vacuna se derivó de las glicoproteínas de la membrana intestinal del parásito (131). Otra vacuna, Bovilis Huskvac, se desarrolló contra el nematodo *Dictyocaulus viviparus*. La vacuna se desarrolló utilizando larvas vivas irradiadas del tercer estadio del parásito (132). Además, se desarrolló una vacuna Providean Hidatil EG95 contra el cestodo *Echinococcus granulosus* (133). La vacuna recombinante se desarrolló en Argentina y se probó en ovejas y llamas (134). Si bien se han utilizado varias proteínas recombinantes (como GST, proteasa aspártica, tetraspanina, etc.) en ensayos clínicos para desarrollar vacunas contra helmintos en humanos (135), aún no se dispone de una vacuna comercialmente disponible y eficaz.

1.2.11. Candidatos a vacunas en la investigación sobre duelas del hígado

Para desarrollar una vacuna comercialmente disponible para controlar *F. hepatica* y *F. gigantica* en el ganado, se han seleccionado y utilizado varios genes, ya sea de forma individual o en combinación. La mayoría de las vacunas

se encuentran en forma nativa o recombinante. Generalmente, se evalúa una vacuna en función de su capacidad protectora en el hospedero; el problema aquí es que estas proporciones son variables y no se pueden repetir en los ensayos. Se desea que una vacuna ideal inicie una protección de alrededor del 80 % y se presume que esto reduciría la carga media en el hígado por debajo de 30 a 53 fasciolas, un nivel umbral en el que la productividad del ganado no se vería afectada (128).

Se han explorado muchos candidatos; los principales son GST, catepsinas, FABP y otros incluyen leucina aminopeptidasa, hemoglobina, paramiosina, peroxirredoxina y proteínas tegumentales de *Fasciola* (96). Si bien la protección de estos diversos candidatos a vacunas de *Fasciola* puede ser tan baja como 0 %, los ensayos de otros candidatos sugieren que se podría lograr una protección de alrededor del 98 % (136). Los hallazgos también indican que los extractos de duelas adultas que utilizan alumbre o adyuvante de Freund podrían iniciar aproximadamente el 85-96 % de protección (137), mientras que las metacercarias de *F. hepatica* irradiadas, a pesar de poder desexquistarse, causan poco daño tisular; sin embargo, dosis altas de estas no parecen conferir suficiente protección (138,139).

De manera similar, las proteínas del tegumento, considerando que sirven como el principal sitio de interacción entre los trematodos del hígado y el hospedero, podrían ser candidatos prometedores para vacunas. Además de estos, hay otros productos excretores-secretorios (ES) de trematodos, que se cree que pueden suprimir las respuestas inmunológicas de tipo 1 y, por lo tanto, también son inmunomoduladores (140). Si bien ahora no existe una vacuna estandarizada,

es importante garantizar la replicabilidad de los ensayos, determinar el rendimiento de las vacunas en rebaños en diferentes ubicaciones, evaluar la dosis de la vacuna y su impacto en los tejidos, para controlar la fascioliasis, especialmente porque las poblaciones resistentes a TCBZ están aumentando. A medida que los datos “ómicos” se vuelven gradualmente más disponibles y accesibles, la anotación estructural de las familias de genes candidatos se vuelve más fácil. La disponibilidad de diferentes conjuntos de datos ómicos de alta calidad podría proporcionar una gran cantidad de información sobre la biología de los trematodos que puede aprovecharse para comprender mejor este complejo organismo.

1.2.12. Adaptación de *F. hepatica*

Varios factores podrían influir en la diversidad genética de una población de duelas. Como se mencionó anteriormente, el hecho de que *Fasciola* spp. sean hermafroditas significa que la endogamia es posible, lo que influye en la propagación de ciertos alelos en la población de duelas. Por lo tanto, la autofecundación podría facilitar la propagación de rasgos como la resistencia a los antihelmínticos, especialmente si es un rasgo heredado de forma recesiva (25). De manera similar, en el ciclo de vida del parásito, existe una expansión clonal en el hospedero intermediario caracol, lo que lleva a la pérdida de algunas variantes genéticas y potencialmente causa un cuello de botella en la población de duelas.

Según hallazgos previos, *F. hepatica* experimenta una expansión clonal genética en el hospedero intermediario (141), la falta de una expansión clonal genética podría llevar a una variación reducida en la variación genética en metacercarias y la eventual reducción de la diversidad genética de la población de duelas. Finalmente, el parásito tiene un rango de hospedero definitivo diverso y es capaz de adaptarse para asegurar la supervivencia. Los hallazgos indican que el parásito es altamente diverso genéticamente y capaz de un rápido flujo genético entre poblaciones (25). Esto podría estar asociado con el alto nivel de polimorfismos encontrados en el genoma (99), y potencialmente hace que las intervenciones con medicamentos y vacunas sean desafiantes.

La diversidad en la población de duelas y la fertilización cruzada entre *F. hepatica* y *F. gigantica* hacen que una vía de resistencia a medicamentos multigénica sea altamente posible. Por lo tanto, se plantean varias preguntas de investigación como, ¿Cómo responderán varias poblaciones de duelas (incluso dentro de una ubicación geográfica) a nuevos medicamentos (127)?, ¿Con qué rapidez una población de duelas desarrollará resistencia a un medicamento efectivo?, ¿Cómo puede el libre flujo de animales a través de varias ubicaciones geográficas influir en la estructura de la población de duelas? Proporcionar respuestas a estas preguntas sería clave para controlar el parásito. Con la creciente aplicación de tecnologías ómicas a la investigación de duelas, pronto se resolverán estas inquietudes.

1.2.13. Avances ómicos recientes: aplicación en la investigación de duelas

Existen avances graduales en tecnologías ómicas como genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, vaccinómica, epigenómica, fenómica, etc. en las últimas dos décadas, pero solo hay unos pocos informes disponibles sobre estudios de duelas hepáticas en comparación con otros organismos. Estas y otras herramientas posgenómicas han respaldado la identificación de nuevos antígenos, aunque esto no ha sido muy aplicable en el desarrollo de vacunas contra duelas hepáticas (96). A pesar de estas limitaciones, se han reportado esfuerzos para detectar, caracterizar y explorar varias moléculas hospedero-parásito de duelas hepáticas con enfoque en el proteoma del tegumento, vesículas extracelulares, secretomas; esto ha ayudado a comprender la biología del parásito (142–144).

De manera similar, el análisis proteómico se ha utilizado para resaltar los roles de los GST en la desintoxicación de TCBZ (111,145), la importancia de las catepsinas en los trematodos hepáticos (146), que son moléculas identificadas importantes para varios procesos biológicos en los NEJ (147). Actualmente se han publicado los genomas de *F. hepatica*, *F. gigantica*, *F. buski* y algunos otros trematodos, estos facilitan el análisis genómico comparativo (99,148–150). La disponibilidad de genomas de estas especies estrechamente relacionadas garantiza que las relaciones ortólogas de los genes se evalúen mejor, aunque los estudios comparativos a nivel genómico requieren gran experiencia en bioinformática.

Se encuentran disponibles amplios conjuntos de datos de transcriptomas de varias etapas de *F. hepatica* que proporcionan una imagen del patrón de expresión de los genes en cada etapa de desarrollo de este parásito (99), y se han utilizado para evaluar los patrones de expresión génica en aislamientos de *F. hepatica* sensibles y resistentes a TCBZ y albendazol (110). No hay duda que se necesitan más estudios ómicos en la biología de los trematodos, ya que estos proporcionan una comprensión imparcial de la biología del parásito. Una interpretación e integración serían clave para desarrollar una medida de control sostenible.

A pesar de los enormes avances logrados en la comprensión de la biología de los trematodos, el desarrollo de vacunas y las interacciones farmacológicas, todavía queda mucho por hacer. Para facilitar la investigación genómica de los trematodos hepáticos, es necesario abordar los desafíos actuales de la anotación. Por ejemplo, el uso de bases de datos públicas para anotar nuevas secuencias de duelas puede ser un desafío si la mayoría de los genes no están nombrados adecuadamente o se describen como “desconocidos” (151). Esto podría ir desde no encontrar coincidencias significativas en el BLAST hasta no encontrar vías a las que asignar secuencias genéticas. Además, las anotaciones del genoma de *Fasciola* disponibles tienden a no contener mucha información asociada con los identificadores genéticos. En futuros estudios ómicos, la anotación detallada de secuencias facilitaría la integración de varios campos como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. Si bien la metabolómica es un campo en constante crecimiento en la investigación biomédica, actualmente no hay informes de su uso en estudios de duelas

hepáticas. La metabolómica, una cuantificación a gran escala de moléculas pequeñas, puede utilizarse potencialmente para evaluar la respuesta de *F. hepatica* frente al TCBZ e identificar a qué proteínas se une (13). La probabilidad de que la resistencia a los antihelmínticos sea multigénica hace que la comprensión del mecanismo sea complicada (127).

Los estudios epigenómicos podrían facilitar potencialmente la comprensión de la regulación de la transcripción genética en el parásito. Esto podría explicar los patrones de expresión en respuesta a fármacos o vacunas. Con el uso creciente de diversas tecnologías ómicas en la investigación biomédica, como la fenómica y la vaccinómica, para evaluar la relación entre los factores ambientales de un organismo y la expresión genética (152), y la inmunogenicidad en relación con el desarrollo de vacunas (153), respectivamente, es solo cuestión de tiempo antes de que los científicos exploren cómo la genética de las poblaciones de duelas influye en la resistencia a los medicamentos y la eficacia de las vacunas.

1.2.14. Investigación sobre la fascioliasis: perspectiva desde la ganadería

Para un productor tradicional, la investigación de las duelas es buena si el ganado está sano. En otras palabras, el objetivo principal de un ganadero es mejorar la salud de los animales, aumentar la productividad y reducir las pérdidas económicas por enfermedades. La fascioliasis causa pérdidas económicas significativas a una granja. La dependencia excesiva de TCBZ por parte de los granjeros es un factor clave en el desarrollo y la propagación de la resistencia, por lo que se cree que el desarrollo de modelos económicos en su

producción permitiría a los granjeros tomar medidas de control informadas. Sin embargo, para lograr esto, es necesario desarrollar un medio de diagnóstico sostenible, preciso, asequible y rápido al que puedan acceder los ganaderos (25).

Otras prácticas de gestión de la granja, como el pastoreo y la densidad del rebaño, el uso adecuado de medicamentos, nuevos sistemas adecuados de cuarentena animal y la vigilancia, son clave para abordar la fascioliasis en las granjas (55). Como se están realizando esfuerzos de investigación sobre el desarrollo de vacunas, cabría esperar que se realicen varios ensayos antes de la producción comercial. Es importante contar con protocolos estandarizados para garantizar que se puedan comparar los resultados de varios ensayos (127). Esto facilitaría el desarrollo de procesos, así como la actualización de los responsables de las políticas y las partes interesadas sobre el nivel de progreso. Por lo tanto, las medidas de control implicarían claramente ayudar a los ganaderos a tomar decisiones informadas sobre la gestión de las explotaciones, desarrollar un nuevo fármaco con una eficacia igual o superior a la del TCBZ y, potencialmente, desarrollar una vacuna eficaz y comercialmente asequible (51). A largo plazo, si se quiere controlar o tal vez erradicar la fasciolosis en todo el mundo, se requerirá un equilibrio adecuado de prácticas agrícolas e investigación intensiva.

1.3. Definición de términos básicos

Fascioliasis: enfermedad parasitaria de animales empleados en la producción y humanos, causada por trematodos del género *Fasciola*. Estos helmintos son caracterizados por poseer un ciclo biológico complejo que compromete a moluscos como hospederos intermediarios donde se desarrollará la fase asexual y hospederos definitivos vertebrados donde ocurrirá la reproducción sexual (154). La fascioliasis se encuentra distribuida en todos los continentes, con excepción de la Antártida (155). Se presume que la existencia de *F. hepatica* y *F. gigantica* data de hace 5 millones de años aproximadamente, entre el límite del Mioceno y el Plioceno (149). Por esta enfermedad, se estiman pérdidas económicas anuales de US\$3 mil millones alrededor del mundo en el sector agropecuario (74). Este trematodo es sensible a un derivado de los benzimidazoles, llamado TCBZ y que tiene actividad a nivel de la β -tubulina (51,156).

Triclabendazol: es un fármaco perteneciente al grupo de los benzimidazoles cuyos metabolitos sistémicos disponibles son el TCBZ.SO₂ y TCBZ.SO, mediados por la actividad enzimática de la flavina monooxigenasa (FMO) y citocromo P450 (CYP450). El retorno al compuesto original de TCBZ se produce a través de la microbiota ruminal (157). Las concentraciones plasmáticas máximas de TCBZ.SO se obtienen a las 36 h postratamiento con dosis orales de 10 mg/kg de peso vivo en ovinos (41,158). Este benzimidazol halogenado se administra en dosis de 12 mg/kg de peso total en bovinos y 15 mg/kg de peso total en caprinos (98,159). La forma disponible para humanos es el Egaten[®], Novartis, 250 mg/tableta (10 mg/kg en dos dosis tomadas con

24 h de diferencia) (160–162). En cuanto a su mecanismo de acción, TCBZ se dirige a los microtúbulos del parásito y se observa una necrosis severa en la mitad posterior del cuerpo a las 72 h postratamiento (pt), y a las 96 h pt el tegumento suele desprenderse por completo; la formación de huevos cesa a las 48 h pt. y se desencadenan eventos apoptóticos en los testículos, tejido vitelino y ovarios (163,164).

Resistencia y Susceptibilidad al TCBZ: el TCBZ, que era el fármaco más efectivo contra formas de *F. hepatica* inmaduras y adultas, aún no tiene un mecanismo de acción bien detallado a nivel molecular; sin embargo, la monoterapia sin rotación antihelmíntica ha propiciado el desarrollo de aislamientos resistentes del trematodo (13,23,165). Se puede determinar la resistencia a un fármaco o más, cuando *in vivo* o *in vitro*, no existe muerte del parásito o daño tisular y reproductivo al aplicar las dosis adecuadas según la especie a tratar; también, se puede hacer un conteo de huevos en heces (por sus siglas en inglés, FEC), una prueba de reducción en el FEC (FECRTs) y métodos serológicos y de coproantígeno que permitan definir la efectividad del tratamiento (13,51). En Cajamarca, existe una cepa resistente a TCBZ y albendazol, comprobadas con las técnicas anteriormente mencionadas (24,26). Tal es así que, la eficacia del TCBZ en humanos puede llegar a 69,23 % y en bovinos a un 25,20 % (19,26).

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Ubicación geográfica

Las actividades de campo se realizaron en el Matadero Municipal de Cajamarca y el procesamiento de las muestras para los respectivos experimentos en el Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, distrito, provincia y región Cajamarca, Perú (Figura 2).

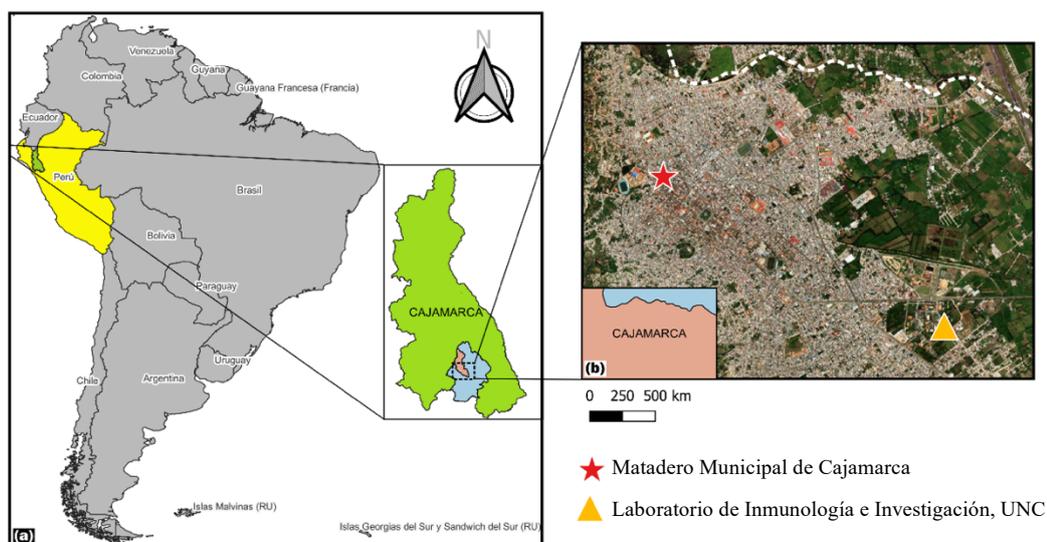


Figura 2. Área geográfica en la que se ejecutaron las fases de campo y laboratorio de la presente investigación

El Matadero Municipal de Cajamarca se encuentra ubicado en la latitud -7,153217458 Sur y la longitud -78,521679639 Oeste. La Universidad Nacional de Cajamarca, se sitúa en la latitud -7,168104710 Sur y la longitud -78,493849039 Oeste. Ambos lugares se encuentran en el distrito de Cajamarca,

la distancia entre ambos puntos es de 3,49 km y comparten la siguiente altitud y características climatológicas (Tabla 1) [64]:

Tabla 1. Altitud y datos climatológicos del distrito de Cajamarca considerando los promedios anuales de cada parámetro en el 2024

Parámetro	Valor
Altitud	2759,53 m s.n.m.
Humedad Relativa	69,75 %
Temperatura Máxima	25,48 °C
Temperatura Mínima	5,54 °C
Promedio de Precipitación al Día	0,97 mm/día
Suma de Precipitación Anual	353,22 mm

Fuente: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>

2.2. Diseño de la investigación

2.2.1. Obtención de la muestra

El diseño corresponde a un muestreo no probabilístico por conveniencia. La colección de muestras se realizó en horas de la mañana en el Matadero Municipal de Cajamarca, los lunes y martes (horario: 6:00 – 9:00 a.m.) de los meses de enero a diciembre del 2023, donde se tuvo a disposición una caja térmica con el interior atemperado de forma estable a 37 °C; esto, por la ambientación con una bolsa con agua caliente que regulaba la temperatura y un termómetro de mercurio que facilitó su control en lo que duraba cada actividad matutina.

Dentro de la caja térmica se colocaron ocho tubos de plástico con fondo cónico (capacidad de 50 mL), con 25 mL de una solución de RPMI + antibacteriano-antimicótico (RPMI-anti) atemperada también a 37 °C. Se expresan detalles de los insumos en la sección Equipos y Materiales.

Con la bioseguridad correspondiente (empleo de guantes de látex estériles, alcohol de 70° y papel toalla para las superficies donde se colocaron los cuchillos y pinzas), se procedió a realizar cortes transversales en la cara visceral de los hígados. Así, quedaron expuestos los conductos biliares, se buscó el conducto principal y se masajeó el parénquima permitiendo la salida de los parásitos (ver Anexo 1).

Cuando el hígado fue positivo a *F. hepatica*, se colectaron al menos treinta parásitos (con una longitud superior o igual a 1 cm, que presentaron una alta motilidad a la observación directa y una morfología aparentemente normal e íntegra), se las colocó en un tubo con RPMI-anti a 37 °C. Se rotularon los frascos adecuadamente y se trasladaron lo antes posible al Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNC.

Entre cada hígado inspeccionado, se lavaron cuchillos y pinzas y se los desinfectó con alcohol. También, se cambiaron los guantes para proceder a revisar la siguiente víscera.

Los parásitos colectados de cada hígado de bovino representaron un lote y, por ende, una muestra. El número de parásitos colectados en total fue superior al número de los que lograron ser seleccionados para su exposición en los

distintos grupos experimentales y también a las fasciolas que finalmente fueron fenotipificadas en un patrón de susceptibilidad (Tabla 2).

Tabla 2. Fases de selección y distribución de grupos experimentales por lote de fasciolas de un hígado bovino

Fase 1: Selección de fasciolas para adaptación <i>in vitro</i>		
Paso	Muestra	Número de muestras
Obtención de muestras en el Matadero Municipal de Cajamarca	Hígado de bovino con fasciolas	≥ 30 fasciolas
Fasciolas seleccionadas para su incubación <i>in vitro</i>	Fasciolas	24
Fase 2: Selección de fasciolas para exposición a TCBZ		
Clasificación	Muestra	Número de muestras
Grupo Tratamiento 1 o GS (dosis única de TCBZ.SO a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fasciolas de la fase 1	4
Grupo Tratamiento 2 o GR (dosis de TCBZ.SO a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con repetición de dosis a las 12 h posprimera exposición)	Fasciolas de la fase 1	4
Grupo Control o GC (dosis de DMSO a 3750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con repetición de dosis a las 12 h posprimera exposición)	Fasciolas de la fase 1	4

2.2.2. Lavado y selección de fasciolas

En el Laboratorio, se desinfectaron los frascos de manera externa con alcohol. Luego, se encendió la cabina de bioseguridad que un día antes fue esterilizada con UV (254 nm) por 30 minutos y en la misma se realizaron los lavados empleando una solución fisiológica de cloruro de sodio al 0,9 % atemperada a 37 °C.

En el primer lavado, se decantó con cuidado el medio de transporte (RPMI-anti) de los tubos con fondo cónico de 50 mL hacia un recipiente de descarte y se colocaron aproximadamente 40 mL de solución fisiológica. Se realizaron dos lavados más con intervalos de veinte minutos cada uno. Después de cada lavado, los tubos con los parásitos fueron incubados en total oscuridad a 37 °C.

Al finalizar el tercer lavado (aprox. 45 min después del primer lavado), se vertieron las fasciolas (con 40 mL de solución fisiológica) de cada lote en una placa Petri de plástico (150 × 20 mm) (ver Anexo 2). Del total de cada lote procesado, se seleccionaron 24 fasciolas con motilidad de tres cruces (+++) a la observación directa. En tal sentido, a continuación, se describe la interpretación de los valores que se consideraron para evaluar la viabilidad de los parásitos (Tabla 3) (46,49,166):

Tabla 3. Valores de viabilidad considerados en la evaluación y selección de fasciolas

Valor	Descripción
+++	Movimiento del cuerpo ondulante y rápido perceptible a simple vista
++	Movimiento del cuerpo ondulante lento y perceptible a simple vista
+	Cuerpo semirígido, movimiento casi imperceptible, observado al estereomicroscopio
-	Movimiento nulo por muerte, determinada luego de observar 2 minutos

Las 24 fasciolas seleccionadas fueron manipuladas con hisopos estériles (extremo de algodón, cuerpo de madera y longitud de 15 cm) y depositados de forma aleatoria en dos placas de cultivo celular de doce pocillos cada una.

Previamente, en cada pocillo se habían colocado 3 mL de RPMI+antibacteriano y antimicótico (RPMI-anti) + Suero Fetal Bovino (SFB) al 5 %. Después de un periodo de incubación de seis horas a 37 °C y 5 % de CO₂, cada lote quedó codificado tal como se muestra en la Figura 3:

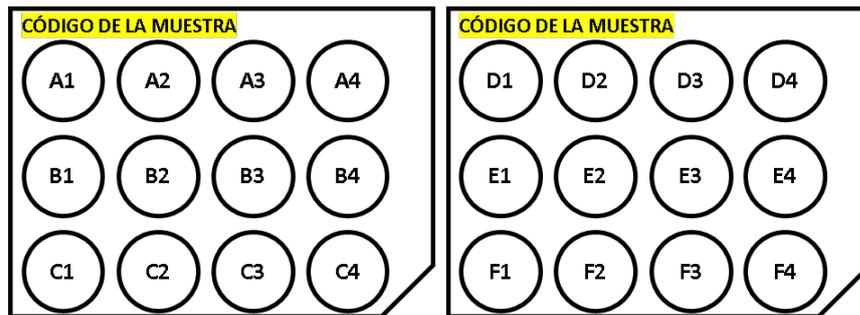


Figura 3. Distribución de un lote de fasciolas seleccionadas por su viabilidad y colocadas aleatoriamente en placas de cultivo celular con medio RPMI-anti + SFB al 5 %

2.2.3. Cambio de medio de cultivo a fasciolas incubadas preexposición a TCBZ

Luego de seis horas, las fasciolas en las placas de cultivo fueron examinadas en un estereomicroscopio para evaluar su viabilidad (según la Tabla 3); los datos se registraron en un cuaderno de laboratorio. Después, se realizó el primer cambio de medio RPMI-anti + SFB. Para ello, el medio donde se mantuvieron a las fasciolas fue descartado y reemplazado por medio nuevo a 37 °C (3 mL por pocillo). Las fasciolas quedaron incubando por veinticuatro horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Se repitió la valoración individual de cada parásito y el cambio de medio. Luego de lo cual, permanecieron veinticuatro horas más en las mismas condiciones de incubación (ver Anexo 3).

2.2.4. Exposición a TCBZ.SO

Transcurridas las cincuenta y cuatro horas pos-selección de las fasciolas en el primer día, fueron valoradas por su actividad y se escogieron doce parásitos con el mejor puntaje de viabilidad (Tabla 3), posterior a lo cual, fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales (ver Figura 4 y Anexo 4):

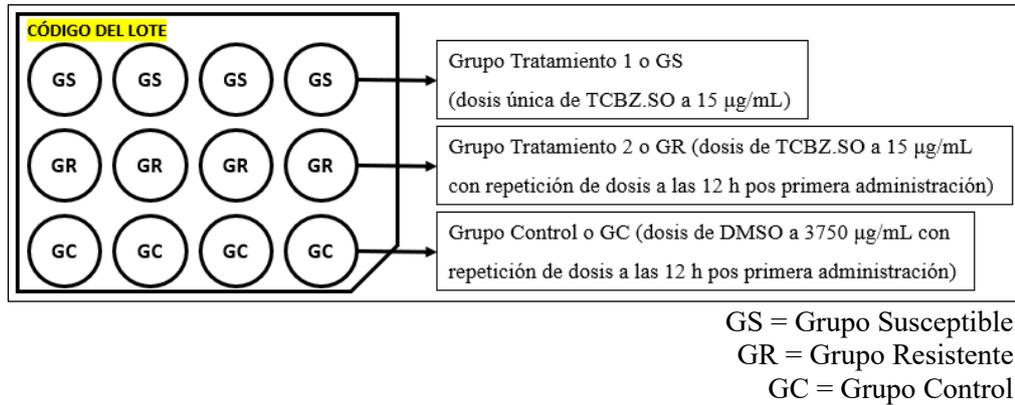


Figura 4. Distribución de los grupos experimentales

El tiempo cero fue la denominación que se le dio al momento en el que las fasciolas dejaron de ser expuestas a los tratamientos indicados en la Figura 4 (RPMI-anti + TCBZ.SO o RPMI-anti + DMSO) y se les administró el medio con RPMI-anti + SFB. Para el caso del GS, el tiempo cero fue después de doce horas del inicio de la exposición a TCBZ. En los casos del GR y GC, el tiempo cero comenzó a las veinticuatro horas luego de las dos dosis de TCBZ a las que fueron sometidos.

En cada cambio de medio, se valoró la viabilidad individual de las fasciolas y se registraron dichos datos. En el caso del GS, las siguientes valoraciones y cambios de medio se realizaron a las 12, 24 y 48 h post tiempo cero. En los

tratamientos GR y GC, los siguientes cambios de medio y calificación de la viabilidad individual, se hicieron a las 24, 48 y 72 h después del tiempo cero.

2.2.5. Determinación fenotípica de fasciolas

Una condición clave para determinar los fenotipos de las fasciolas sometidas a los distintos grupos de tratamiento, fue que las fasciolas del GC debieron mantenerse con ++ o +++ a las 72 h posttiempo cero. Si el 50 % (n = 2) de las fasciolas de cada GC murieron o presentaron + en viabilidad, el lote se eliminó completamente del experimento.

La determinación fenotípica (susceptible, resistente o indeterminado) se dio bajo los criterios establecidos en la Tabla 4.

2.3. Población, muestra y unidad de análisis

Población: todas las fasciolas de los hígados de bovinos sacrificados en el Matadero Municipal de Cajamarca.

Muestra: cada grupo o lote de fasciolas que provenían del mismo hígado de bovino.

Unidad de análisis: fasciolas seleccionadas para el cultivo inicial y las que posteriormente pasaron a conformar los distintos grupos experimentales (GS, GR y GC).

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de información

2.4.1. Microscopía convencional

Se empleó el estereomicroscopio binocular Carl Zeiss Stemi 305, con una capacidad de aumento de 0,8X a 4,0X y fuente de luz LED blanca. En este equipo se colocaron las placas de cultivo para la valoración de la viabilidad de las fasciolas en los periodos de evaluación.

2.4.2. Clasificación fenotípica

Se clasificaron como fasciolas susceptibles aquellas que murieron o presentaron una viabilidad reducida (categorizada como +) dentro de las 48 h posttiempo cero. Por otro lado, se definieron como fenotipos resistentes aquellas que mantuvieron una viabilidad activa (++ o +++) hasta las 72 h posttiempo cero (Tabla 4). Los fenotipos indeterminados correspondieron a fasciolas con comportamiento distinto o contrario a los patrones establecidos para los grupos susceptibles (GS) o resistentes (GR) dentro de cada lote experimental (ver Anexo 5 y 6).

Tabla 4. Valores de viabilidad por grupo de tratamiento que permitió declarar la susceptibilidad fenotípica al TCBZ.SO de las fasciolas en experimentación

Grupo Experimental	Fenotipo	Susceptible	Resistente	Indeterminado	Grupo Control o GC (3750 µg/mL de DMSO, con repetición de dosis a las 12 h posprimera exposición)
Grupo de Tratamiento 1 o GS Dosis única: TCBZ.SO a 15 µg/mL Tiempo de exposición: 12 h Declaración de fenotipo: 48 h posttiempo cero		-		++	
		+		+++	
Grupo de Tratamiento 2 o GR Dos dosis: TCBZ.SO a 15 µg/mL (repetición a las 12 h posprimera dosis) Tiempo de exposición total: 24 h Declaración de fenotipo: 72 h posttiempo cero			++	+	++/+++
			+++	-	

2.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información

Se calcularon frecuencias absolutas y relativas en base al número de fasciolas colectadas del matadero, fasciolas seleccionadas para cultivo, fasciolas sometidas a algún grupo experimental y fasciolas con fenotipo determinado según los criterios evaluados. A las frecuencias relativas se les estimaron los intervalos de confianza al 95% (IC95%). Para una estimación más precisa y adecuada de la variabilidad basada en el comportamiento de los datos se emplearon dos métodos. Para frecuencias intermedias y altas se aplicó el método de Wald y los resultados se expresaron porcentaje \pm error estándar. Para proporciones pequeñas o cuando el número de casos positivos por

categoría fue igual o menor a cinco (≤ 5) se utilizó el intervalo de Clopper-Pearson exacto, presentado como un rango asimétrico. En los casos donde se obtuvieron frecuencias relativas del 0%, el IC95% se estimó con la Regla de 3 de la fórmula de Hanley donde el IC: $(0,3/n)$; si $n > 30$ (167).

Se ejecutó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) para determinar asociación entre las fasciolas declaradas como susceptibles, resistentes o indeterminadas según cada grupo experimental vs. los meses; siempre que el valor de p fue menor a 0,05 se concluyó que hay diferencia significativa. Para saber si los datos obtenidos durante el estudio (número de fasciolas susceptibles, resistentes e indeterminadas por lote) tuvieron una distribución normal o no, se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Según esto, se analizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para datos paramétricos o coeficiente de correlación de rangos de Spearman (r_s) para los no paramétricos. Estos datos se procesaron ejecutando el software IBM SPSS v.27.0.1 (IBM Corporation, EE.UU.), además, se presentaron tablas y figuras para un mejor entendimiento elaboradas en el software Microsoft Excel 2019®.

2.6. Equipos y materiales

Refrigeradora, congeladora, cabina de flujo laminar, incubadora con sistema para CO₂ incorporado, placas de cultivo celular, micropipetas, tubos de plástico con fondo cónico de 50 mL, crioviales de 5 mL, crioviales de 2 mL, tips para micropipetas de 10 a 1000 μ L, guantes de látex, hisopos estériles, tachos de descarte, placas de Petri, etc. Además, se usaron los siguientes insumos:

- RPMI-1640 con L-glutamina y bicarbonato de sodio <RPMI>, en presentación de 500 mL (Sigma-Aldrich®) y conservado entre 2 – 8 °C.
- Dimetilsulfóxido <DMSO> en presentación de 500 mL concentrado a 500 mg/mL (Sigma-Aldrich®) y conservado a temperatura ambiente.
- Solución de antibacteriano-antimicótico <anti> a 100X en presentación de 100 mL (Sigma-Aldrich®) que contiene: 10 000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina por mL, conservado a -20 °C.
- Suero Fetal Bovino <SFB> en presentación de 100 mL (Biowest®), conservado a -20 °C.
- Triclabendazol sulfóxido <TCBZ.SO> con presentación en polvo de 10 mg (Sigma-Aldrich®), conservado a -20 °C.
- Suero fisiológico estéril de cloruro de sodio al 0,9 % en presentación de 1 L (Medifarma®), conservado a temperatura ambiente.

La preparación de las soluciones empleadas en la presente investigación se detalla a continuación:

2.6.1. Preparación de RPMI-anti + SFB (medio de cultivo)

- Retirar 25 mL del frasco de RPMI y añadir 25 mL de SFB. Homogenizar el frasco suavemente.
- Retirar 5 mL de la solución de RPMI + SFB y añadir 5 mL de anti. Homogenizar el frasco suavemente.

- La concentración final debe ser de un RPMI-anti + SFB: al 1X de anti (5 mL de anti) y 5 % de SFB (25 mL de SFB) en 470 mL de RPMI.

2.6.2. Preparación de RPMI-anti (medio de transporte)

- Retirar 5 mL del frasco RPMI y añadir 5 mL de anti. Homogenizar el frasco suavemente.
- La concentración final debe ser de un RPMI-anti: al 1X de anti (5 mL de anti) en 495 mL de RPMI.

2.6.3. Preparación del stock de TCBZ.SO

- Atemperar 5 mL de DMSO y 5 mL de RPMI-anti a 37 °C.
- Añadir 500 µL de DMSO al frasco de TCBZ.SO. Homogenizar aspirando suavemente con la pipeta y retirar la mezcla a un tubo de 50 mL con fondo cónico.
- Repetir el paso anterior hasta diluir y retirar todo el TCBZ de su frasco original y completar 5 mL en el tubo de 50 mL con fondo cónico (para eso, pipetear 10 veces de 500 en 500 µL intentando colectar todo el producto).
- Finalmente, se añaden 5 mL de RPMI-anti hasta completar los 10 mL y se separan alícuotas en viales de 1 mL para su congelación a -20 °C. La concentración final debe ser de 1 mg de TCBZ en 1 mL de DMSO + RPMI-anti (1000 µg de TCBZ.SO en 1 mL de RPMI-anti).

2.6.4. Preparación de TCBZ.SO a 15 µg/mL

- Atemperar a 37 °C el RPMI-anti suficiente para el número de fasciolas que se enfrentan a TCBZ.SO (3 mL por pocillo), considerando que el GR tiene dos repeticiones de dosis.
- Por ejemplo: en un lote, las fasciolas seleccionadas para el GS y el GR hacen un total de 8, a cada una le corresponde 3 mL, requiriendo para la exposición 24 mL. Sumándole la repetición de dosis a las 4 fasciolas del GR, son 12 mL más. El total para enfrentar a un lote contra TCBZ.SO, es de 36 mL de solución compuesta por RPMI-anti + TCBZ.SO.
- Para calcular la cantidad de TCBZ.SO, tomamos como ejemplo los requerimientos de un lote a enfrentar. Aplicamos la fórmula para dilución de soluciones concentradas:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$1000 \mu g * V1 = 15 \mu g * 36 mL$$

$$V1 = 540 / 1000 mL$$

$$V1 = 0,54 mL \text{ o } 540 \mu L \text{ de TCBZ.SO}$$

- Ahora solo se calcula la diferencia para obtener el volumen de RPMI-anti a usar en la solución:

$$36 mL - 0,54 mL = 35,46 mL \text{ de RPMI - anti}$$

2.6.5. Preparación de stock de DMSO

- Atemperar 2,5 mL de RPMI-anti a 37 °C en un tubo de 5 mL.
- Atemperar 2,5 mL de DMSO y añadir al tubo de RPMI-anti.

- Homogenizar el tubo suavemente para obtener una concentración final de 250 mg/mL (250 000 µg/mL).

2.6.6. Preparación de RPMI-anti + DMSO para el GC

- Considerando que el stock de TCBZ.SO tiene una concentración de 250 mg/mL de DMSO, se pretende exponer al GC con la misma concentración que se tiene de DMSO en la solución de RPMI-anti + TCBZ.SO. Para ello, se calcula la concentración del DMSO en una solución de 15 µg/mL de TCBZ.SO en RPMI-anti:

Primero:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$1000 \mu\text{g} * 1 \text{ mL} = 15 \mu\text{g} * V2$$

$$V2 = 1000 \text{ mL} / 15$$

$$V2 = 66,67 \text{ mL de RPMI - anti + DMSO}$$

Segundo:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$250 \text{ mg} * 1 \text{ mL} = C2 * 66,67 \text{ mL}$$

$$C2 = 250 \text{ mg} / 66,67$$

$$C2 = 3,749 \text{ mg o } 3749 \mu\text{g de DMSO}$$

- Con el ejemplo de un lote de fasciolas que son expuestas, en el GC se tienen a 4 parásitos (corresponde 3 mL a cada una, considerando también dos repeticiones) y se debe preparar una solución total de 24 mL de RPMI-anti + DMSO. Para ello, se emplea la siguiente fórmula:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$3749 \mu\text{g} * 24 \text{ mL} = 250\,000 \mu\text{g} * V2$$

$$V2 = 89\,976 \text{ mL} / 250\,000$$

$$V2 = 0,359 \text{ mL o } 359 \mu\text{L de DMSO}$$

- Ahora solo se calcula la diferencia para obtener el volumen de RPMI-anti a usar en la solución:

$$24 \text{ mL} - 0,349 \text{ mL} = 23,651 \text{ mL de RPMI} - \text{anti}$$

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Presentación de resultados

a. Parásitos viables en condiciones experimentales

Entre enero a diciembre del 2023 se recolectaron 218 lotes de *F. hepatica* de hígados de bovinos sacrificados en el Matadero Municipal de Cajamarca. Sin embargo, solo 203 cumplieron con los criterios de viabilidad e integridad para que pasen a conformar algún grupo experimental (Figura 5 y Tabla 5).

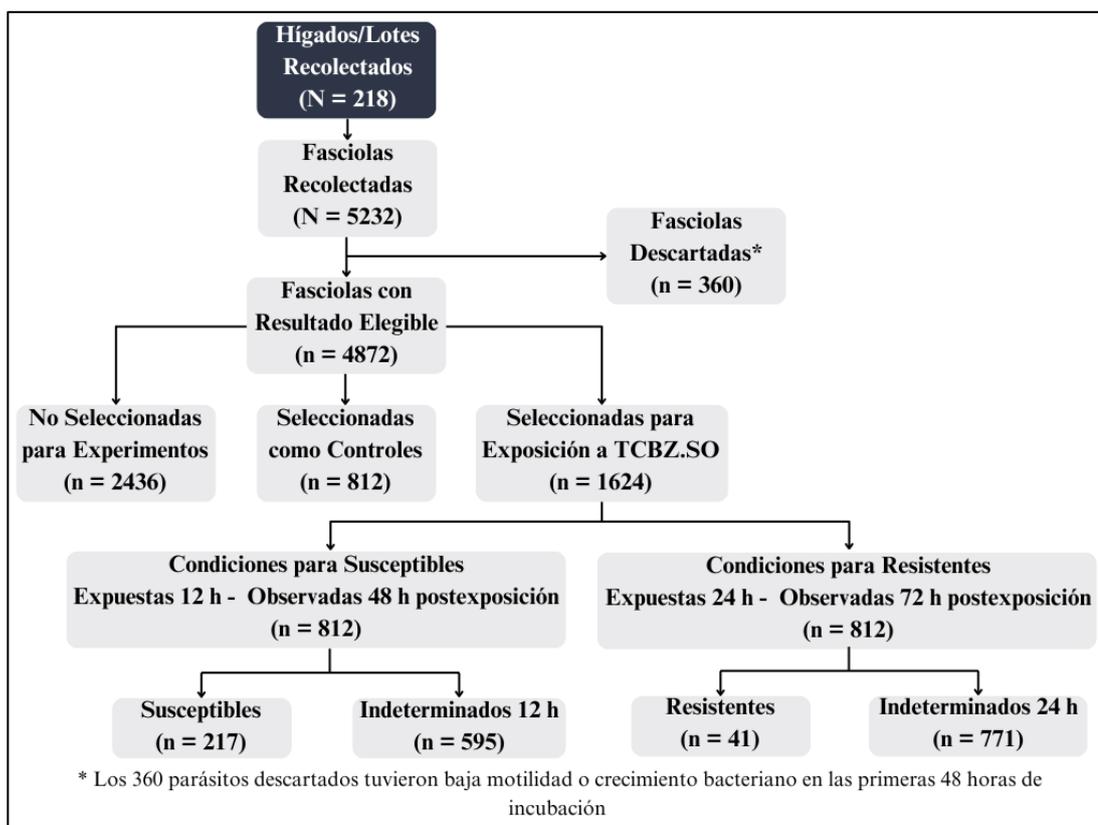


Figura 5. Resumen de número de fasciolas recolectadas, seleccionadas por su viabilidad, expuestas a TCBZ.SO y declaradas en algún patrón fenotípico

La Tabla 5 muestra que, de los 203 lotes viables recolectados de hígados de bovinos en el Matadero Municipal de Cajamarca, se logró exponer un total de 1624 especímenes de *F. hepatica* a TCBZ.SO, distribuidos equitativamente entre protocolos de 12 y 24 h. Los meses con mayor número de lotes fueron enero (25 lotes; 12,32 %), octubre (24 lotes; 11,82 %) y noviembre (23 lotes; 11,33 %), lo cual sugiere un patrón estacional influido posiblemente por la dinámica de transmisión en pasturas contaminadas. Diciembre tuvo un número considerablemente menor de muestras, lo que podría estar relacionado con la disminución de lluvias o del faenado en temporada festiva.

Tabla 5. Número y frecuencia de lotes de fasciolas colectadas de hígados de bovinos en el Matadero Municipal de Cajamarca expuestas a algún grupo experimental, 2023

Mes	Total Lotes Viables	Porcentaje (\pm IC95%)	Número de Fasciolas Expuestas	Expuestas 12 h	Expuestas 24 h
	n = 203	100 %	n = 1624	n = 812	n = 812
Enero	25	12,32 (\pm 4,52)	200	100	100
Febrero	21	10,34 (\pm 4,19)	168	84	84
Marzo	18	8,87 (\pm 3,91)	144	72	72
Abril	18	8,87 (\pm 3,91)	144	72	72
Mayo	17	8,37 (\pm 3,81)	136	68	68
Junio	20	9,85 (\pm 4,10)	160	80	80
Julio	11	5,42 (\pm 3,11)	88	44	44
Agosto	13	6,40 (\pm 3,37)	104	52	52
Setiembre	10	4,93 (\pm 2,98)	80	40	40
Octubre	24	11,82 (\pm 4,44)	192	96	96
Noviembre	23	11,33 (\pm 4,36)	184	92	92
Diciembre	3	1,48 (0,31 – 4,26)	24	12	12

IC: intervalo de confianza

b. Pruebas de susceptibilidad de *F. hepatica*

Los bovinos positivos a *F. hepatica* que llegaron al Matadero Municipal de Cajamarca durante el año 2023, presentaron fenotipos de parásitos susceptibles y resistentes a TCBZ.SO. De esta manera se observó un mayor número de fasciolas que fueron notoriamente afectadas en el protocolo de dosis única por 12 h en comparación con el número final de parásitos clasificados como resistentes, que se expusieron a dos dosis cada 12 h por un total de 24 h (Tabla 6).

Tabla 6. Número de fasciolas colectadas de bovinos expuestas a TCBZ.SO clasificadas según fenotipo, 2023

Mes	Fenotipo Susceptible	Fenotipo Resistente	Fenotipo Indeterminado 12 h	Fenotipo Indeterminado 24 h	Total
	n	n	n	n	n
Enero	33	1	67	99	200
Febrero	23	8	61	76	168
Marzo	36	2	36	70	144
Abril	26	8	46	64	144
Mayo	21	2	47	66	136
Junio	13	3	67	77	160
Julio	9	2	35	42	88
Agosto	22	3	30	49	104
Setiembre	6	6	34	34	80
Octubre	9	3	87	93	192
Noviembre	16	3	76	89	184
Diciembre	3	0	9	12	24
Total	217	41	595	771	1624
(±IC95%)	(13,36 ± 1,65 %)	(2,52 ± 0,76 %)	(36,64 ± 2,34 %)	(47,48 ± 2,43 %)	(100 %)

IC: intervalo de confianza

De un total de 1624 *F. hepatica* expuestas *in vitro* a TCBZ.SO, se identificaron tres fenotipos generales: susceptibles, resistentes e indeterminados. El 13,36 % de los individuos fue catalogado como susceptible, mientras que un 2,52 % mostró un fenotipo resistente confirmado. Sin embargo, la mayoría (84,11 %) presentó características fenotípicas indeterminadas, siendo distribuidas en dos tiempos de exposición: 36,64 % a las 12 h y 47,48 % a las 24 h. Esta amplia proporción de resultados no concluyentes sugiere una respuesta heterogénea al fármaco en condiciones *in vitro*, probablemente influida por factores como la variabilidad genética o diferencias en la tasa de absorción del TCBZ.SO. Es destacable que marzo registró el mayor número de fasciolas susceptibles (36 casos), y febrero y abril los picos más altos de fenotipos resistentes (8 casos cada uno), lo que podría relacionarse con variaciones estacionales en la exposición antiparasitaria previa del ganado. Asimismo, el mes de octubre evidenció un notable incremento en fenotipos indeterminados a las 12 h, notándose que amerita una evaluación complementaria del contexto epidemiológico o técnico de dicha recolección.

La clasificación de fenotipos por lotes de fasciolas expuestas a TCBZ.SO se denominaron susceptibles y resistentes, cuando presentaron ambos fenotipos (susceptibles + resistentes) se les denominó “mixtos” (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación fenotípica general de los lotes de *F. hepatica* colectados de bovinos tras 12 h o 24 h de exposición a TCBZ.SO *in vitro*, 2023

Clasificación Fenotípica de los Lotes				
Mes	Solo Susceptibles	Solo Resistentes	Mixtos (S + R)	Indeterminados
Enero	14	1	0	10
Febrero	7	1	4	9
Marzo	13	0	2	3
Abril	10	1	4	3
Mayo	6	0	1	10
Junio	8	1	1	10
Julio	3	0	1	7
Agosto	7	0	2	4
Setiembre	3	2	2	3
Octubre	5	1	1	17
Noviembre	8	1	0	14
Diciembre	2	0	0	1
Total	86	8	18	91
(N = 203)	(42,36	(3,94	(8,87	(44,83
(±IC95%)	± 6,80 %)	± 2,68 %)	± 3,91 %)	± 6,84 %)

S = Sensibles, R = Resistentes
 IC: intervalo de confianza

La Tabla 7 muestra la clasificación fenotípica global de los lotes de *F. hepatica* tras exposición a TCBZ.SO *in vitro* durante 12 y 24 h, permitiendo observar el comportamiento de cada lote frente al antiparasitario. El 42,36 % de los lotes estuvo conformado exclusivamente por fasciolas susceptibles, mientras que solo el 3,94 % presentó resistencia homogénea. En el 8,87 % de los lotes, se detectó la coexistencia de fenotipos mixtos (susceptibles y resistentes). Por otro lado, el 44,83 % no pudo ser clasificado de manera definitiva y se mantuvieron como lotes indeterminados. La identificación de lotes mixtos podría reflejar la aparición progresiva de respuestas heterogéneas al fármaco, constituyendo una

señal de alerta ante la posible emergencia de subpoblaciones con potencial resistencia.

Tabla 8. Frecuencias y asociación con los meses del año de fenotipos de fasciolas susceptibles e indeterminadas colectadas de bovinos y expuestas a TCBZ.SO por 12 h, 2023

Mes	Fenotipo Susceptible	% (±IC95%)	<i>p</i> valor	Fenotipo Indeterminado 12 h	% (±IC95%)	<i>p</i> valor
	n = 217	100 %		n = 595	100 %	
Enero	33	15,21 (± 4,78)	<0,001*	67	11,26 (± 2,54)	0,009*
Febrero	23	10,60 (±4,10)		61	10,25 (± 2,44)	
Marzo	36	16,59 (± 4,95)		36	6,05 (± 1,92)	
Abril	26	11,98 (± 4,32)		46	7,73 (± 2,15)	
Mayo	21	9,68 (± 3,93)		47	7,90 (± 2,17)	
Junio	13	5,99 (± 3,16)		67	11,26 (± 2,54)	
Julio	9	4,15 (± 2,65)		35	5,88 (± 1,89)	
Agosto	22	10,14 (± 4,02)		30	5,04 (± 1,76)	
Setiembre	6	2,76 (± 2,18)		34	5,71 (± 1,87)	
Octubre	9	4,15 (± 2,65)		87	14,62 (± 2,84)	
Noviembre	16	7,37 (± 3,48)		76	12,77 (± 2,68)	
Diciembre	3	1,38 (0,29 – 3,99)		9	1,51 (± 0,98)	

*Significativo al 99 %; Chi cuadrado
IC: intervalo de confianza

La Tabla 8 muestra la distribución mensual de *F. hepatica* con fenotipo susceptible e indeterminado tras 12 h de exposición a TCBZ.SO, acompañada de los valores *p* obtenidos mediante prueba de Chi cuadrado. De los 217

especímenes clasificados como susceptibles, marzo concentró el mayor porcentaje (16,59 %), seguido de enero (15,21 %). En contraste, diciembre registró el porcentaje más bajo de casos susceptibles (1,38 %). En cuanto al fenotipo indeterminado ($n = 595$), octubre fue el mes con mayor frecuencia (14,62 %), seguido de noviembre (12,77 %) y enero/junio (11,26 % cada uno). En ambos fenotipos se observaron diferencias estadísticamente significativas en los distintos meses.

Este patrón refleja una estacionalidad clara en la distribución de los fenotipos. El predominio de fasciolas susceptibles en los primeros meses del año podría estar asociado a ciclos de transmisión más recientes, mientras que el aumento de fenotipos indeterminados en octubre y noviembre sugiere una mayor heterogeneidad fenotípica o disminución en la eficacia discriminante del bioensayo. La diferencia significativa en los valores p también refuerza la necesidad de considerar factores como el uso de antiparasitarios a lo largo del año y el estado fisiológico de los hospederos como posibles moduladores de la respuesta fenotípica observada.

La Tabla 9 muestra la frecuencia mensual de fasciolas clasificadas como resistentes e indeterminadas tras 24 h de exposición a TCBZ.SO. De los 41 casos catalogados como resistentes, febrero y abril concentraron la mayor proporción (19,51 % cada uno), seguidos por setiembre (14,63 %). En contraste, durante diciembre no se registraron casos de resistencia, mientras que enero presentó un único caso (2,44 %). Estas diferencias entre meses resultaron estadísticamente significativas, sugiriendo una baja probabilidad de

encontrar fenotipos resistentes en los primeros meses del año. Por otro lado, entre los 771 fenotipos indeterminados en este grupo experimental, la distribución fue más homogénea, con enero, octubre y noviembre como los meses de mayor frecuencia (12,84 %, 12,06 % y 11,54 %, respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla 9. Frecuencias y asociación con los meses del año de fenotipos de fasciolas resistentes e indeterminadas colectadas de bovinos y expuestas a TCBZ.SO por 24 h, 2023

Mes	Fenotipo Resistente	% (\pm IC95%)	<i>p</i> valor	Fenotipo Indeterminado 24 h	% (\pm IC95%)	<i>p</i> valor
	n = 41	100 %		n = 771	100 %	
Enero	1	2,44 (0,06 – 12,86)	0,014*	99	12,84 (\pm 2,36)	0,997
Febrero	8	19,51 (7,38 – 31,64)		76	9,86 (\pm 2,10)	
Marzo	2	4,88 (0,60 – 16,53)		70	9,08 (\pm 2,03)	
Abril	8	19,51 (7,38 – 31,64)		64	8,30 (\pm 1,95)	
Mayo	2	4,88 (0,60 – 16,53)		66	8,56 (\pm 1,97)	
Junio	3	7,32 (1,54 – 19,92)		77	9,99 (\pm 2,12)	
Julio	2	4,88 (0,60 – 16,53)		42	5,45 (\pm 1,60)	
Agosto	3	7,32 (1,54 – 19,92)		49	6,36 (\pm 1,72)	
Setiembre	6	14,63 (3,82 – 25,45)		34	4,41 (\pm 1,45)	
Octubre	3	7,32 (1,54 – 19,92)		93	12,06 (\pm 2,30)	
Noviembre	3	7,32 (1,54 – 19,92)		89	11,54 (\pm 2,26)	
Diciembre	0	0,00 (0,00 – 0,73)		12	1,56 (\pm 0,87)	

*Significativo al 99 %; Chi cuadrado
IC: intervalo de confianza

Este comportamiento fenotípico sugiere una posible estacionalidad en la aparición de aislamientos resistentes, con picos durante los meses intermedios del año que podrían coincidir con periodos de mayor presión farmacológica. La falta de significancia estadística de la mayoría de los valores asociados al fenotipo indeterminado indica que estas clasificaciones podrían estar influenciadas más por factores técnicos, como la tolerancia intermedia o la variabilidad en la absorción del fármaco, que por patrones estacionales definidos (168). Sin embargo, la recurrencia de fenotipos resistentes en meses como febrero, abril y setiembre refuerza la hipótesis de la existencia de subpoblaciones resistentes emergentes en determinados periodos del año.

La Figura 6 muestra la fluctuación mensual de los fenotipos extremos (susceptibles y resistentes) en los especímenes de *F. hepatica* evaluados durante el año 2023. Se observa que la mayor frecuencia de fasciolas susceptibles se concentró en los primeros meses del año, con un pico en marzo, mientras que los casos de resistencia se distribuyeron de manera más dispersa, con aumentos moderados en febrero, abril y setiembre. Esta distribución sugiere una dinámica estacional de la respuesta al TCBZ, posiblemente influenciada por factores como el historial terapéutico de los animales, la carga parasitaria acumulada en las pasturas o las condiciones ambientales que favorecen ciclos parasitarios más cortos o prolongados.

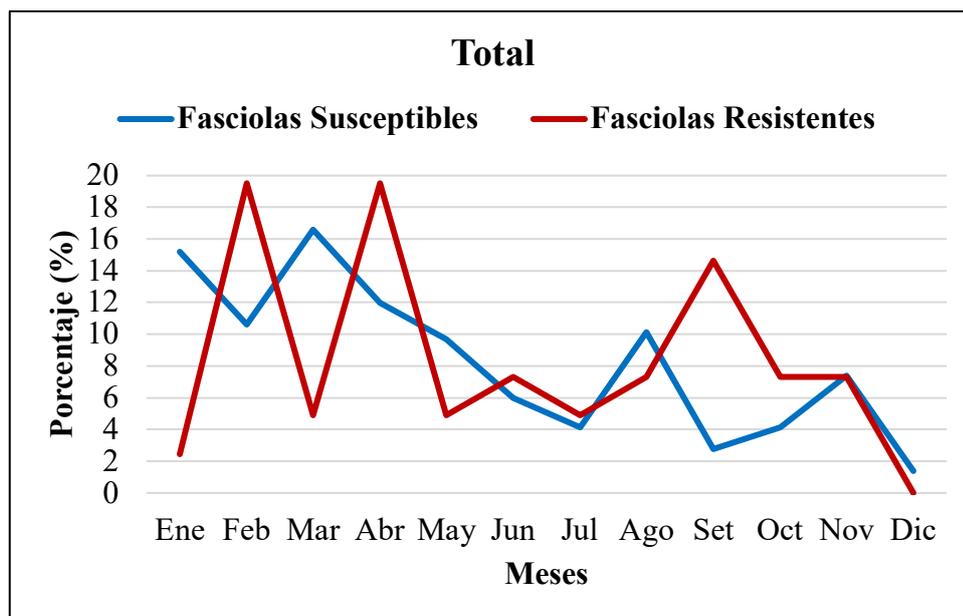


Figura 6. Variación mensual general en la distribución de especímenes de *F. hepatica* de bovinos clasificados como susceptibles o resistentes, 2023

Resulta llamativa la diferencia en la densidad de casos entre ambos fenotipos: los susceptibles representaron un volumen notoriamente mayor en comparación con los resistentes, lo que respalda los hallazgos cuantitativos presentados en las Tablas 8 a 11. Esta diferencia puede interpretarse como un reflejo de la predominancia de aislamientos aún susceptibles al TCBZ en la región, aunque la presencia constante de fenotipos resistentes a lo largo de varios meses del año indica una circulación activa de subpoblaciones con posible resistencia establecida. Este patrón justifica la necesidad de implementar medidas de vigilancia continua y estrategias de rotación de antiparasitarios, especialmente durante los periodos con mayor frecuencia de casos mixtos o resistencia incipiente.

La Tabla 10 resume los coeficientes de correlación calculados entre los distintos fenotipos de *F. hepatica* (susceptibles, resistentes, e indeterminados a 12 h y 24 h) y la variable temporal (meses del año). Se emplearon los coeficientes de Spearman y Pearson según la naturaleza de los datos.

Tabla 10. Coeficientes de correlación entre la clasificación fenotípica de fasciolas de bovinos expuestas a TCBZ.SO *in vitro* y los meses del año 2023

Fenotipo	Coefficiente de Correlación	Meses
Susceptible	Spearman (r_s)	-0,11
	p valor	<0,001*
Resistente	Spearman (r_s)	-3,80
	p valor	0,879
Indeterminado 12 h	Spearman (r_s)	0,08
	p valor	0,002*
Indeterminado 24 h	Pearson (r)	1,40
	p valor	0,955

*Significativo ($p < 0,01$)

Los resultados indican una correlación negativa débil y significativa entre el fenotipo susceptible y los meses del año (Spearman: -0,11; $p < 0,001$), sugiriendo una ligera tendencia a la disminución de fasciolas susceptibles hacia los meses finales del año. En cambio, no se halló correlación significativa para los fenotipos resistentes (Spearman: -3,80; $p = 0,879$), justificando su aparición esporádica y no vinculada directamente a la estacionalidad.

En relación con los fenotipos indeterminados, se observó una correlación positiva muy baja y estadísticamente significativa para los individuos clasificados a las 12 h (Spearman: 0,08; $p = 0,002$), mientras que para los observados a las 24 h no se identificó correlación estadística relevante (Pearson: 1,40; $p = 0,955$). En conjunto, los hallazgos indican que el fenotipo

susceptible tiende a disminuir con el tiempo, mientras que los patrones de resistencia no siguen un comportamiento temporal definido, concordando con la hipótesis de que la resistencia a TCBZ en *F. hepatica* se presenta de manera focal, aunque con potencial de expansión.

3.2. Análisis, interpretación y discusión de resultados

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia relevante sobre la heterogeneidad fenotípica de *F. hepatica* frente a TCBZ.SO en ensayos *in vitro*, en una región hiperendémica como Cajamarca. La identificación de una proporción reducida de fasciolas susceptibles (13,36 %), una presencia baja pero preocupante de aislamientos resistentes (2,52 %) y una mayoría significativa de casos indeterminados (84,11 %) plantea una problemática compleja. Esta situación refleja no solo variaciones biológicas propias del parásito, sino también, la influencia de factores asociados a la presión farmacológica del entorno, los protocolos utilizados para la evaluación fenotípica y las prácticas de manejo ganadero en la zona.

El predominio de fenotipos indeterminados, especialmente bajo exposiciones de 12 h, sugiere la existencia de un espectro continuo de respuesta al TCBZ.SO que no puede ser adecuadamente explicado por un modelo dicotómico simple de susceptibilidad/resistencia. En este contexto, para describir a aquellos individuos que se sitúan en un estado intermedio o transicional de susceptibilidad farmacológica frente al TCBZ.SO, estudios recientes han demostrado que *F. hepatica* posee la capacidad de modular sus rutas de detoxificación a través de la expresión diferencial de enzimas de Fase II como

glutación-S-transferasas (GSTs), citocromo P450 (CYP450), y proteínas de transporte transmembrana como las P-glicoproteínas (P-gp) (51,117). Estos mecanismos podrían conferir a ciertos individuos una capacidad adaptativa intermedia que, en condiciones experimentales, se manifiesta con patrones ambiguos o imprecisos de motilidad y daño tegumentario, clasificados en este estudio como fenotipos indeterminados.

La comparación con reportes nacionales previos, como el de Ortiz *et al.* (26), que reportan una tasa de resistencia superior al 20 %, sugiere que la región de Cajamarca aún no presenta una resistencia generalizada al TCBZ. Sin embargo, la presencia de lotes con fenotipos resistentes o mixtos en meses como febrero, abril y setiembre evidencia la existencia de focos potencialmente activos de resistencia incipiente, los cuales podrían diseminarse si no se establecen estrategias integradas de control oportunamente. Dicha diseminación podría verse favorecida por factores como la movilidad del ganado, el uso masivo de TCBZ sin rotación de principios activos y la deficiente fiscalización sobre la calidad de los productos farmacéuticos comercializados, problemas documentados en regiones ganaderas de América del Sur (13,110).

La estacionalidad observada en los patrones fenotípicos refuerza la necesidad de incorporar factores ecoepidemiológicos en el análisis de la resistencia al TCBZ. La mayor proporción de aislamientos susceptibles en los primeros meses del año podría estar asociada a ciclos de infección más recientes, en los cuales la presión farmacológica acumulada es aún limitada. En contraste, la concentración de fenotipos indeterminados y resistentes en los últimos meses

podría estar relacionada con la acumulación de tratamientos y la reexposición a metacercarias persistentes en el ambiente. Howell *et al.* (4) han señalado que las precipitaciones intensas en zonas geográficamente altas favorecen la supervivencia prolongada de caracoles limneidos y facilitan ciclos de reinfección continuos, lo que genera una presión selectiva constante sobre las poblaciones de *F. hepatica*.

Desde el punto de vista experimental, este estudio confirma que la exposición prolongada (24 h) mejora la capacidad de discriminación del bioensayo, al reducir la proporción de indeterminados y aumentar la detección de lotes mixtos. Este hallazgo coincide con las observaciones de Kelley *et al.* (13), quienes observaron que la manifestación de daño fenotípico en *F. hepatica* suele retrasarse hasta después de las 18 h postexposición, especialmente en aislamientos con tolerancia parcial al TCBZ. En consecuencia, la adopción de protocolos extendidos y estandarizados se vuelve fundamental para caracterizar con mayor precisión la resistencia *in vitro*.

Para la interpretación de estos hallazgos se requiere reconocer las limitaciones inherentes al modelo experimental. Si bien, el sistema *in vitro* permite controlar múltiples variables y eliminar factores confusores relacionados al hospedero, no permite evaluar aspectos clave como la farmacocinética de la molécula, las interacciones inmunológicas ni el metabolismo hepático. Además, el entorno controlado del ensayo no reproduce con fidelidad la dinámica de absorción y detoxificación que ocurre en condiciones fisiológicas. Por ello, estos resultados obtenidos deben complementarse con estudios *in*

vivo, pruebas de reducción de recuento de huevos (FECRT, por sus siglas en inglés), y análisis moleculares de biomarcadores, incluyendo polimorfismos en genes CYP450, EGFR-PI3K-mTOR-S6K, expresión de transportadores ABC y perfiles transcriptómicos (29,30,113).

A nivel molecular, la resistencia al TCBZ ha sido asociada a cambios en múltiples rutas celulares, incluyendo la activación de la vía Ras-adenilato ciclasa (110), la modificación en la distribución subcelular de GSTs (122,169), y la alteración del sistema tegumentario mediado por FABPs (119). Estos mecanismos confieren a *F. hepatica* una notable capacidad adaptativa que puede manifestarse fenotípicamente como una disminución progresiva en la eficacia del fármaco, sin requerir la presencia de una mutación específica, como sí ocurre en nematodos en respuesta a los benzimidazoles (109).

Desde la perspectiva de salud pública y sanidad animal, la identificación de aislamientos con posible resistencia en una región como Cajamarca, donde la prevalencia de fascioliasis bovina supera el 80 % en algunos mataderos (170), constituye una amenaza real para la productividad pecuaria, la seguridad alimentaria, y la eficacia terapéutica en humanos. Esta preocupación se acentúa dado que el TCBZ es actualmente el único trematocida aprobado por la OMS para el tratamiento de la fascioliasis en humanos (67). En consecuencia, se requiere una respuesta estratégica basada en vigilancia farmacológica activa, rotación racional de antihelmínticos, fortalecimiento de los métodos diagnósticos, y programas de educación dirigidos al sector ganadero.

A la luz de los resultados obtenidos, se recomienda la implementación de programas regionales de vigilancia de la eficacia del TCBZ empleando bioensayos estandarizados en combinación con herramientas moleculares. Así mismo, se sugiere incorporar análisis de genotipos circulantes y aplicar enfoques multiómicos para profundizar en el estudio de la plasticidad adaptativa del parásito. Estas acciones permitirán anticipar posibles escenarios de falla terapéutica y contribuirán al diseño de políticas públicas de control más sostenibles y basadas en evidencia, especialmente para los contextos ganaderos vulnerables.

Finalmente, este estudio demuestra la presencia de una población fenotípicamente heterogénea de *F. hepatica* en Cajamarca, caracterizada por la presencia incipiente de focos de resistencia al TCBZ.SO y una alta proporción de respuestas intermedias. Estos hallazgos, contextualizados con la literatura científica más actual, exigen una reconfiguración urgente de los métodos diagnósticos, los programas de tratamiento y la investigación básica aplicada a fascioliasis en Perú.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

La presente investigación ha evidenciado una notable heterogeneidad fenotípica en *F. hepatica* frente al triclabendazol sulfóxido (TCBZ.SO) en la región de Cajamarca. La predominancia de fenotipos indeterminados, junto con la identificación de aislamientos resistentes, sugiere la existencia de mecanismos de adaptación o tolerancia parcial al fármaco, lo que plantea desafíos significativos para el control efectivo de la fascioliasis en zonas hiperendémicas.

Asimismo, se ha observado que el tiempo de exposición al TCBZ.SO influye en la manifestación fenotípica del parásito, con una mayor diferenciación de fenotipos en exposiciones prolongadas. Este hallazgo resalta la importancia de estandarizar los protocolos de bioensayo para una evaluación más precisa de la susceptibilidad de *F. hepatica* al fármaco.

Además, la variabilidad estacional en la respuesta del parásito al TCBZ.SO, con una mayor proporción de fenotipos susceptibles en los primeros meses del año y un aumento de fenotipos indeterminados y resistentes hacia los últimos meses, indica que factores ecológicos y prácticas de manejo ganadero podrían estar influyendo en la dinámica de la resistencia.

CAPÍTULO V

SUGERENCIAS

A partir de los hallazgos obtenidos, se recomienda implementar programas de vigilancia farmacológica en la región de Cajamarca, utilizando protocolos estandarizados de bioensayo *in vitro* e incorporando herramientas moleculares para la detección temprana de resistencia al TCBZ.SO. Estas acciones permitirán monitorear la eficacia del fármaco y tomar decisiones informadas para su uso racional.

Asimismo, es fundamental promover la rotación de fármacos antiparasitarios y el uso racional del TCBZ.SO en las prácticas ganaderas, con el fin de reducir la presión selectiva y prevenir la expansión de aislamientos resistentes. Para ello, se sugiere desarrollar programas de capacitación y conscientización dirigidos a los productores ganaderos sobre la importancia del manejo adecuado de los antihelmínticos y las implicaciones de la resistencia en la productividad y salud animal.

Finalmente, se recomienda fomentar investigaciones futuras que incorporen enfoques moleculares y ómicos para una caracterización más profunda de la diversidad genética de *F. hepatica* y una comprensión más completa de los mecanismos de resistencia. Estos estudios contribuirán al diseño de estrategias de control más efectivas y sostenibles, y servirán como base para la formulación de políticas públicas orientadas a la mitigación de la fascioliasis en Perú.

REFERENCIAS

1. Marcos L, Terashima A, Leguia G, Canales M, Espinoza J, Gotuzzo E. La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2007;27: 389–396. <https://doi.org/10.47892/rgp.2007.274.583>.
2. Charlier J, Duchateau L, Claerebout E, Williams D, Vercruyssen J. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2007;78(1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.09.010>.
3. Charlier J, Vercruyssen J, Morgan E, Van Dijk J, Williams DJL. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology*. 2014;141(3): 326–335. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001662>.
4. Howell A, Baylis M, Smith R, Pinchbeck G, Williams D. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2015;121(1–2): 41. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.05.013>.
5. Espinoza JR, Terashima A, Herrera-Velit P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2010;27(4): 604–612. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342010000400018>.
6. Ruiz J, Rojas-Moncada J, Escalante B, Torrel T, Vargas-Rocha L. Helmintos y pérdidas económicas por decomisos en animales de abasto en Cajamarca, Perú. *Revista de Salud Animal*. 2025;47: 1–7. <https://censa.edicionescervantes.com/index.php/RSA/article/view/1366>
7. Olaechea F. Trematodes y Cestodes. In: Suárez V, Olaechea F, Rossanigo C, Romero J (eds.) *Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América*. Argentina: EEA INTA, Anguil; 2007. p. 159–168. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi70_-_ver_editores_y_autores_colaboradores.pdf [Accessed 25th July 2022].
8. Instituto Nacional de Estadística e Informática. *Resultados Definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. Ministerio de Agricultura y Riego. 2013. <http://proyectos.inei.gob.pe/web/documentospublicos/resultadosfinalesivcenagro.pdf>
9. Chuquiruna M. *Frecuencia de Fasciolosis y Cisticercosis en Animales Beneficiados en el Camal Municipal de Baños del Inca*. [Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario] Universidad Nacional de Cajamarca; 2011.

10. Huamán E. *Frecuencia de Fasciolosis y Cisticercosis en animales beneficiados en el Camal Municipal de Cajamarca*. [Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario] Universidad Nacional de Cajamarca; 2011.
11. Saba R, Korkmaz M, Inan D, Mamikoğlu L, Turhan Ö, Günseren F, et al. Human fascioliasis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10(5): 385–387. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00820.x>.
12. Keiser J, Engels D, Büscher G, Utzinger J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2005;14(12): 1513–1526. <https://doi.org/10.1517/13543784.14.12.1513>.
13. Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*. 2016;32(6): 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002>.
14. Villegas F, Angles R, Barrientos R, Barrios G, Valero MA, Hamed K, et al. Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001720>.
15. Brennan GP, Fairweather I, Trudgett A, Hoey E, McCoy, McConville M, et al. Understanding triclabendazole resistance. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007;82(2): 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.01.009>.
16. Ortiz P, Castope N, Cabrera M, Farias C, Suarez G, Lanusse C, et al. Pharmacokinetic evaluation of different generic triclabendazole formulations in heifers. *New Zealand Veterinary Journal*. 2014;62(5): 279–285. <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.925411>.
17. Gil LC, Díaz A, Rueda C, Martínez C, Castillo D, Apt W. Fascioliasis hepática humana: resistencia al tratamiento con triclabendazol. *Revista Médica de Chile*. 2014;142: 1330–1333. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001000014>.
18. Mamani W, Condori R. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a Albendazol y Triclabendazol, La Paz - Bolivia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2009;20(2): 254–262. <https://doi.org/10.15381/rivep.v20i2.619>.
19. Ortiz P, Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, Chilón S, Hobán C, Cabrera M, et al. Controlled Efficacy Test of Triclabendazole Against *Fasciola Hepatica* Derived from Human Infections. In: *27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Madison, Estados Unidos: WAAVP; 2019. p. 214. <http://www.waavp2019.com/wp-content/uploads/2019/07/WAAVP2019-Abstract-Book.pdf> [Accessed 17th July 2022].
20. Terashima A, Marcos L. Fracaso de dosis única de triclabendazole para el tratamiento de fasciolosis humana. *Acta Médica Peruana*. 2016;33(3): 228–231. <https://doi.org/10.35663/amp.2016.333.117>.

21. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Raffo F, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*. 2011;178(3–4): 364–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.047>.
22. Cabada MM, Lopez M, Cruz M, Delgado JR, Hill V, Clinton White A. Treatment Failure after Multiple Courses of Triclabendazole among Patients with Fascioliasis in Cusco, Peru: A Case Series. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(1): e0004361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004361>.
23. Moll L, Gaasenbeek CPH, Vellema P, Borgsteede FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2000;91(1–2): 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00267-3).
24. Canevari J, Ceballos L, Sanabria R, Romero J, Olaechea F, Ortiz P, et al. Testing albendazole resistance in *Fasciola hepatica*: Validation of an egg hatch test with isolates from South America and the United Kingdom. *Journal of Helminthology*. 2014;88(3): 286–292. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000163>.
25. Beesley NJ, Williams DJL, Paterson S, Hodgkinson J. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance. *International Journal for Parasitology*. 2017;47(1): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.007>.
26. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2013;195(1–2): 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.001>.
27. Fernández V, Ortiz P, Solana MV, Solana H. Differential Activities of Glutathione S-Transferase Isoenzymes in Strains of *Fasciola Hepatica* Susceptible and Resistant to Triclabendazole. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2014;9(4): 177–181. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2014.177.181>.
28. Chilón S. *Diferencia molecular de la Glutathion S Transferasa en cepas de Fasciola hepatica de distinto origen, resistentes al Triclabendazol*. [Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias] Universidad Nacional de Cajamarca; 2019. https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3501/SILVIA_CHILON_YOPLA.pdf?sequence=4&isAllowed=y

29. Scarcella S, Lamenza P, Virkel G, Solana H. Expression differential of microsomal and cytosolic glutathione-S- transferases in *Fasciola hepatica* resistant at triclabendazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012;181(1): 37–39. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.011>.
30. Choi YJ, Rosa BA, Fernandez-Baca M V., Ore RA, Martin J, Ortiz P, et al. Independent origins and non-parallel selection signatures of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica*. *Nature Communications*. 2025;16(1): 2996. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57796-5>.
31. Fernández V. Identification and Differential Activity of Glutathione S-Transferase Mu in Strains of *Fasciola hepatica* Susceptible and Resistant to Triclabendazole. In: Toshiki Asao and Md. Asaduzzaman (ed.) *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal I*. Reino Unido; 2017. p. 273–284. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69189>.
32. Hillyer GV. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology*. 2005;79(3): 241–247. <https://doi.org/10.1079/joh2005304>.
33. Machicado C, Soto MP, Timoteo O, Vaisberg A, Pajuelo M, Ortiz P, et al. Screening the Pathogen Box for Identification of New Chemical Agents with Anti-*Fasciola hepatica* Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(3). <https://doi.org/10.1128/aac.02373-18>.
34. Dixon KE. The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. 1966;56(3): 431–456. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068931>.
35. Ibarra OF, Jenkins DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1984;70(5): 655–661. <https://doi.org/10.1007/bf00926594>.
36. Anderson HR, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: ultrastructural changes to the tegument of juvenile flukes following incubation *in vitro* with the deacetylated (amine) metabolite of diamphenethide. *International Journal for Parasitology*. 1995;25(3): 319–333. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00105-W](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00105-W).
37. Keiser J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology*. 2010;137(3): 589–603. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991739>.
38. Jenkins DC, Topley P, Rapson EB. *Fasciola hepatica in vitro*: increased susceptibility to fasciolicides in a defined serum-free medium. *Parasitology*. 1987;95 (Pt 1)(1): 165–171. <https://doi.org/10.1017/S0031182000057644>.
39. Alvarez LI, Mottier ML, Lanusse CE. Comparative assessment of the access of albendazole, fenbendazole and triclabendazole to *Fasciola hepatica*: effect of bile in the incubation medium. *Parasitology*. 2004;128(Pt 1): 73–81. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004281>.

40. Walker SM, McKinsty B, Boray JC, Brennan GP, Trudgett A, Hoey EM, et al. Response of two isolates of *Fasciola hepatica* to treatment with triclabendazole *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology Research*. 2004;94(6): 427–438. <https://doi.org/10.1007/S00436-004-1222-5>.
41. Henessy DR, Lacey E, Steel JW, Prichard RK. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1987;10(1): 64–72. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2885.1987.TB00078.X>.
42. Coles GC. Anthelmintic activity of triclabendazole. *Journal of Helminthology*. 1986;60(3): 210–212. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00026110>.
43. Robinson MW, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather I. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: beta-tubulin and response to *in vitro* treatment with triclabendazole. *Parasitology*. 2002;124(Pt 3): 325–338. <https://doi.org/10.1017/S003118200100124X>.
44. Robinson MW, Lawson J, Trudgett A, Hoey EM, Fairweather I. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*. 2004;92(3): 205–210. <https://doi.org/10.1007/S00436-003-1003-6>.
45. Stitt AW, Fairweather I. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex). *Parasitology Research*. 1993;79(7): 529–536. <https://doi.org/10.1007/BF00932235>.
46. Duthaler U, Smith TA, Keiser J. *In Vivo* and *In Vitro* Sensitivity of *Fasciola hepatica* to Triclabendazole Combined with Artesunate, Artemether, or OZ78. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11): 4596. <https://doi.org/10.1128/aac.00828-10>.
47. Keiser J, Morson G. *Fasciola hepatica*: tegumental alterations in adult flukes following *in vitro* and *in vivo* administration of artesunate and artemether. *Experimental Parasitology*. 2008;118(2): 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.08.007>.
48. Valero MA, Perez-Crespo I, Khoubbane M, Artigas P, Panova M, Ortiz P, et al. *Fasciola hepatica* phenotypic characterization in Andean human endemic areas: Valley versus altiplanic patterns analysed in liver flukes from sheep from Cajamarca and Mantaro, Peru. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(2): 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.009>.
49. Fernandez-Baca MV, Hoban C, Ore RA, Ortiz P, Choi YJ, Murga-Moreno C, et al. The Differences in the Susceptibility Patterns to Triclabendazole Sulfoxide in Field Isolates of *Fasciola hepatica* Are Associated with Geographic, Seasonal, and Morphometric Variations. *Pathogens*. 2022;11(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens11060625>.

50. Chávez A, Sánchez L, Arana C, Suárez F. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2012;23(1): 90–97. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.887>.
51. Fairweather I, Brennan GP, Hanna REB, Robinson MW, Skuce PJ. Drug resistance in liver flukes. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*. 2020;12: 39–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.003>.
52. Collins JJ. Platyhelminthes. *Current Biology*. 2017;27(7): R252–R256. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016>.
53. Kearn GC. Reproduction in the Platyhelminthes (Flatworms). *Encyclopedia of Reproduction*. 2018; 498–507. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20598-0>.
54. Dettner K. Chemical Defense and Toxins of Lower Terrestrial and Freshwater Animals. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. 2010;4: 387–410. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00100-3>.
55. Caira JN, Littlewood DTJ. Worms, Platyhelminthes. In: Levi SA (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*. 2nd ed. Academic Press; 2013. p. 437–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00166-0>. [Accessed 28th January 2025].
56. El-Bawab F. Phylum Platyhelminthes, Turbellaria. *Invertebrate Embryology and Reproduction*. 2020; 338–386. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814114-4.00007-2>.
57. Zayas RM, Hernández A, Habermann B, Wang Y, Stary JM, Newmark PA. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(51): 18491–18496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509507102>.
58. Bungiro RD, Cappello M. Helminth Infections. In: Johnson LR (ed.) *Encyclopedia of Gastroenterology*. New York: Elsevier; 2004. p. 279–284. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00348-8>. [Accessed 28th January 2025].
59. Jones A, Bray R, Gibson D. *Keys to the Trematoda*. London: CABI Publishing is a division of CAB International; 2005. <https://doi.org/10.1079/9780851995878.0119>. [Accessed 16th June 2022].
60. Saari S, Näreaho A, Nikander S. Trematoda (Flukes). In: Saari S, Näreaho A, Nikander S (eds.) *Canine Parasites and Parasitic Diseases*. Academic Press; 2019. p. 269.
61. Singh PK, Singh RP, Singh P, Singh RL. Food Hazards: Physical, Chemical, and Biological. *Food Safety and Human Health*. 2019; 15–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00002-3>.

62. Mas-Coma S, Bargues MD. Human Liver Flukes: A Review. *Research and Reviews in Parasitology*. 1997;57(4): 145–218.
63. Borgsteede FHM. Diseases of Dairy Animals | Parasites, Internal: Liver Flukes. In: Fuquay JW (ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. Academic Press; 2011. p. 264–269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00150-3>. [Accessed 28th January 2025].
64. Panyarachun B, Ngamniyom A, Sobhon P, Anuracpreeda P. Morphology and histology of the adult *Paramphistomum gracile* Fischoeder, 1901. *Journal of Veterinary Science*. 2013;14(4): 425. <https://doi.org/10.4142/jvs.2013.14.4.425>.
65. Sharma S, Anand N. Parasitic Diseases. In: Sharma S, Anand N (eds.) *Pharmaco Chemistry Library - Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs*. 1st ed. Elsevier; 1997. p. 511.
66. Alvarez CA, Jex AR, Gasser RB, Scheerlinck JPY. Techniques for the diagnosis of *Fasciola* infections in animals: room for improvement. *Advances in Parasitology*. 2014;85: 65–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800182-0.00002-7>.
67. WHO. *Neglected tropical diseases: Fascioliasis*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-fascioliasis> [Accessed 28th January 2025].
68. Rokni MB. Helminth-Trematode: *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. In: Motarjemi Y (ed.) *Encyclopedia of Food Safety*. Academic Press; 2014. p. 140–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00154-2>. [Accessed 28th January 2025].
69. Amer S, Dar Y, Ichikawa M, Fukuda Y, Tada C, Itagaki T, et al. Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (ND1 and COI) gene markers. *Parasitology International*. 2011;60(1): 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.003>.
70. Waikagul J, Sato M, Sato MO. Foodborne trematodes. In: Gajadhar A (ed.) *Foodborne Parasites in the Food Supply Web: Occurrence and Control*. Oxford: Woodhead Publishing; 2015. p. 221–255. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-332-4.00010-2>. [Accessed 28th January 2025].
71. Beesley NJ, Cwiklinski K, Williams DJL, Hodgkinson J. *Fasciola hepatica* from naturally infected sheep and cattle in Great Britain are diploid. *Parasitology*. 2015;142(9): 1196–1201. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000499>.

72. Byrne AW, Graham J, McConville J, Milne G, Guelbenzu-Gonzalo M, McDowell S. Liver fluke (*Fasciola hepatica*) co-infection with bovine tuberculosis in cattle: A prospective herd-level assessment of herd bTB risk in dairy enterprises. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2019;66(4): 1727–1736. <https://doi.org/10.1111/tbed.13209>.
73. Howell AK, McCann CM, Wickstead F, Williams DJL. Co-infection of cattle with *Fasciola hepatica* or *F. gigantica* and *Mycobacterium bovis*: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;14(12): e0226300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226300>.
74. Spithill TW, Smooker PM, Copeman DB. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. Wallingford, UK: CABI Publishing; 1999. p. 465–525.
75. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Chapter 2. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*. 2009;69: 41–146. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(09\)69002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(09)69002-3).
76. Skuce PJ, Zadoks RN. Liver fluke-A growing threat to UK livestock production. *Cattle Practice*. 2013;21: 138–149. <https://www.bcva.org.uk/system/files/whatwedo/Sample%20CP%20paper.pdf>
77. Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Muiño L, Ubeira FM. Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Veterinary Parasitology*. 2011;180(3–4): 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.009>.
78. Sanchez-Vazquez MJ, Lewis FI. Investigating the impact of fasciolosis on cattle carcass performance. *Veterinary Parasitology*. 2013;193(1–3): 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.030>.
79. de Waal T. Parasites, Internal: Liver Flukes. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3rd ed. Academic Press; 2016. p. 451–458. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00741-1>. [Accessed 28th January 2025].
80. Love S. Liver fluke-a review. *NSW DPI - Primefact 813*. 2017; https://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0005/249116/Liver-fluke-a-review.pdf
81. Mitchell G. Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*. 2002;24(7): 378–385. <https://doi.org/10.1136/inpract.24.7.378>.
82. Williams D. Update on liver fluke in sheep. *In Practice*. 2020;42(6): 341–347. <https://doi.org/10.1136/inp.m2398>.

83. Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson JE, Martinez-Moreno A, et al. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65 Suppl 1(Suppl 1): 199–216. <https://doi.org/10.1111/tbed.12682>.
84. Dreyfuss G, Rondelaud D. *Fasciola hepatica*: a study of the shedding of cercariae from *Lymnaea truncatula* raised under constant conditions of temperature and photoperiod. *Parasite (Paris, France)*. 1994;1(4): 401–404. <https://doi.org/10.1051/parasite/1994014401>.
85. González-Miguel J, Becerro-Recio D, Siles-Lucas M. Insights into *Fasciola hepatica* Juveniles: Crossing the Fasciolosis Rubicon. *Trends in Parasitology*. 2021;37(1): 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.007>.
86. CDC. *Fascioliasis*. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Parasitic Diseases and Malaria. <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html> [Accessed 29th January 2025].
87. Caravedo MA, Cabada M. Human Fascioliasis: Current Epidemiological Status and Strategies for Diagnosis, Treatment, and Control. *Research and Reports in Tropical Medicine*. 2020;11: 149–158. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s237461>.
88. Tolan RW. Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on This ‘Neglected’ Neglected Tropical Disease. *Laboratory Medicine*. 2011;42(2): 107–116. <https://doi.org/10.1309/lmlfbb8pw4sa0yji>.
89. Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*. 2010;5(3): 503–515. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.235>.
90. Rojas-Moncada J, Torrel-Pajares T, Vargas-Rocha L. Validation of the natural sedimentation technique in the diagnosis of chronic fasciolosis. *Parasitology International*. 2024;101. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2024.102889>.
91. Dennis WR, Stone WM, Swanson LE. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1954;124(922): 47–50.
92. Lopez M, Morales ML, Konana M, Hoyer P, Pineda-Reyes R, White AC, et al. Kato-Katz and Lumbrellas rapid sedimentation test to evaluate helminth prevalence in the setting of a school-based deworming program. *Pathogens and Global Health*. 2016;110(3): 130–134. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1187361>.
93. Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyssen J, Utzinger J, et al. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*. 2017;12(9): 1723–1732. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.067>.

94. Dusak A, Onur MR, Cicek M, Firat U, Ren T, Dogra VS. Radiological Imaging Features of *Fasciola hepatica* Infection - A Pictorial Review. *Journal of Clinical Imaging Science*. 2012;2: 2. <https://doi.org/10.4103/2156-7514.92372>.
95. Behzad C, Lahmi F, Iranshahi M, Mohammad Alizadeh AH. Finding of Biliary Fascioliasis by Endoscopic Ultrasonography in a Patient with Eosinophilic Liver Abscess. *Case Reports in Gastroenterology*. 2014;8(2): 310. <https://doi.org/10.1159/000367592>.
96. McManus DP. Recent Progress in the Development of Liver Fluke and Blood Fluke Vaccines. *Vaccines*. 2020;8(3): 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030553>.
97. Rosas-Hostos LR, Paredes GA, Ortiz-Martínez Y, Mayer T, Terashima A, Franco-Paredes C, et al. The global prevalence of human fascioliasis: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2023;10. <https://doi.org/10.1177/20499361231185413>.
98. Boray J, Crowfoot P, Strong M, Allison J, Schellenbaum M, Von Orelli M, et al. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *The Veterinary Record*. 1983;113(14): 315–317. <https://doi.org/10.1136/vr.113.14.315>.
99. Cwiklinski K, Dalton JP, Dufresne PJ, La Course J, Williams DJL, Hodgkinson J, et al. The *Fasciola hepatica* genome: Gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biology*. 2015;16(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0632-2>.
100. Vilas R, Vázquez-Prieto S, Paniagua E. Contrasting patterns of population genetic structure of *Fasciola hepatica* from cattle and sheep: implications for the evolution of anthelmintic resistance. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2012;12(1): 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.010>.
101. Lalor R, Cwiklinski K, Calvani NED, Dorey A, Hamon S, Corrales JL, et al. Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola Gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis. *Virulence*. 2021;12(1): 2839–2867. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996520>.
102. Novobilský A, Höglund J. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*. 2015;5(3): 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.07.003>.
103. Martínez-Valladares M, Famularo MDR, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Cordero-Peréz C, Rojo-Vázquez FA. Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitology Research*. 2010;107(5): 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-1989-5>.

104. Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M. The diagnosis of fasciolosis in feces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. *Veterinary Parasitology*. 2013;197(1–2): 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.006>.
105. Ceballos L, Canton C, Pruzzo C, Sanabria R, Moreno L, Sanchis J, et al. The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. 2019;271: 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.001>.
106. Fairweather I, Boray J. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal*. 1999;158(2): 81–112. <https://doi.org/10.1053/tvj.1999.0377>.
107. Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. 2004;23(3): 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2004.08.001>.
108. McConville M, Brennan GP, McCoy M, Castillo R, Hernandez-Campos A, Ibarra F, et al. Immature triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: tegumental responses to *in vitro* treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology Research*. 2007;100(2): 365–377. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0270-4>.
109. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 2004;20(10): 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>.
110. Radio S, Fontenla S, Solana V, Matos Salim AC, Araújo FMG, Ortiz P, et al. Pleiotropic alterations in gene expression in Latin American *Fasciola hepatica* isolates with different susceptibility to drugs. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2553-2>.
111. Chemale G, Morphew R, Moxon J V., Morassuti AL, LaCourse EJ, Barrett J, et al. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. *Proteomics*. 2006;6(23): 6263–6273. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600499>.
112. Ryan LA, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I, Fuchs M, Robinson MW, et al. *Fasciola hepatica* expresses multiple α - and β -tubulin isoforms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008;159(1): 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.02.001>.
113. Morphew RM, Wilkinson TJ, MacKintosh N, Jahndel V, Paterson S, McVeigh P, et al. Exploring and Expanding the Fatty-Acid-Binding Protein Superfamily in *Fasciola* Species. *Journal of Proteome Research*. 2016;15(9): 3308–3321. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6B00331>.

114. Lee YJ, Shi R, Witt SN. The small molecule triclabendazole decreases the intracellular level of cyclic AMP and increases resistance to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064337>.
115. Meaney M, Savage J, Brennan GP, Hoey E, Trudgett A, Fairweather I. Increased susceptibility of a triclabendazole (TCBZ)-resistant isolate of *Fasciola hepatica* to TCBZ following co-incubation *in vitro* with the P-glycoprotein inhibitor, R(+)-verapamil. *Parasitology*. 2013;140(10): 1287–1303. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000759>.
116. Peachey LE, Pinchbeck GL, Matthews JB, Burden FA, Lespine A, von Samson-Himmelstjerna G, et al. P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*. 2017;7(3): 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.10.006>.
117. Devine C, Brennan GP, Lanusse CE, Alvarez LI, Trudgett A, Hoey E, et al. Potentiation of triclabendazole action *in vivo* against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. *Veterinary Parasitology*. 2012;184(1): 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.006>.
118. Muro A, Casanueva P, López-Abán J, Ramajo V, Martínez-Fernández AR, Hillyer G V. Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice. *The Journal of Parasitology*. 2007;93(4): 817–823. <https://doi.org/10.1645/GE-1050R1.1>.
119. Ramos-Benítez MJ, Ruiz-Jiménez C, Aguayo V, Espino AM. Recombinant *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein suppresses toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Scientific Reports 2017 7:1*. 2017;7(1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05735-w>.
120. Casanueva P, Hillyer G V., Ramajo V, Oleaga A, Espinoza EY, Muro A. Immunoprophylaxis Against *Fasciola hepatica* in Rabbits Using a Recombinant Fh15 Fatty Acid-Binding Protein. *Journal of Parasitology*. 2001;87(3): 697–700. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087).
121. Davis CN, Phillips H, Tomes JJ, Swain MT, Wilkinson TJ, Brophy PM, et al. The importance of extracellular vesicle purification for downstream analysis: A comparison of differential centrifugation and size exclusion chromatography for helminth pathogens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2019;13(2): e0007191. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007191>.
122. LaCourse EJ, Perally S, Morphew RM, Moxon J V., Prescott M, Dowling DJ, et al. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001666>.

123. Creaney J, Wijffels GL, Sexton JL, Sandeman RM, Spithill TW, Parsons JC. *Fasciola hepatica*: Localization of Glutathione S-Transferase Isoenzymes in Adult and Juvenile Liver Fluke. *Experimental Parasitology*. 1995;81(1): 106–116. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1098>.
124. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wijffels G, Chandler D, et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology*. 1990;145(11): 3905–3910. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978849>
125. Zafra R, Buffoni L, Pérez-Caballero R, Molina-Hernández V, Ruiz-Campillo MT, Pérez J, et al. Efficacy of a multivalent vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Research*. 2021;52: 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00895-0>.
126. Dalton JP, Robinson MW, Mulcahy G, O'Neill SM, Donnelly S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary Parasitology*. 2013;195(3–4): 272–285. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.008>.
127. Molina-Hernández V, Mulcahy G, Pérez J, Martínez-Moreno Á, Donnelly S, O'Neill SM, et al. *Fasciola hepatica* vaccine: we may not be there yet but we're on the right road. *Veterinary Parasitology*. 2015;208(1–2): 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.004>.
128. Toet H, Piedrafita DM, Spithill TW. Liver fluke vaccines in ruminants: Strategies, progress and future opportunities. *International Journal for Parasitology*. 2014;44(12): 915–927. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.07.011>.
129. Daga V, Green E, Ravichandran P, Short M, May M, Daga V, et al. Perspective Chapter: Multi-Omic Approaches to Vaccine Development against Helminth Diseases. In: *Parasitic Helminths and Zoonoses - From Basic to Applied Research*. IntechOpen; 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102621>. [Accessed 29th January 2025].
130. Drurey C, Coakley G, Maizels RM. Extracellular vesicles: new targets for vaccines against helminth parasites. *International Journal for Parasitology*. 2020;50(9): 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.04.011>.
131. Matos I, Rosa C, Monteiro JP, Leal C, Smith WD, Teixeira M. Attempt to control *Haemonchus contortus* in dairy goats with Barbervax[®], a vaccine derived from the nematode gut membrane glycoproteins. *Small Ruminant Research*. 2017;151: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.016>.
132. Jarrett WFH, Jennings FW, Martin B, McIntyre WIM, Mulligan W, Sharp NCC, et al. A field trial of a parasitic bronchitis vaccine. *Veterinary Record*. 1958;70(22): 451–454.

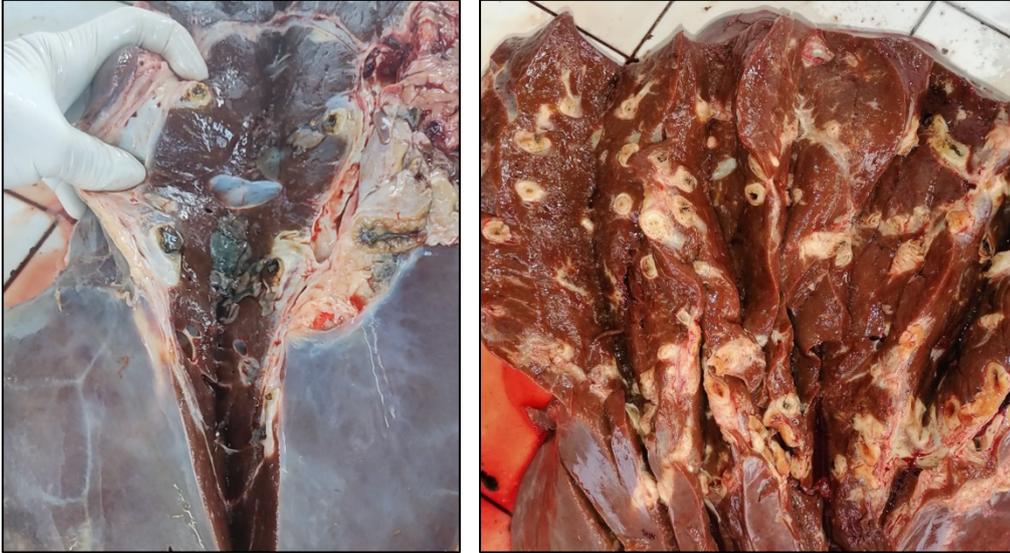
133. Lightowlers MW, Lawrence SB, Gauic CG, Young J, Ralston MJ, Maas D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology*. 1996;18(9): 457–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1996.tb01029.x>.
134. Poggio T V, Jensen O, Mossello M, Iriarte J, Avila HG, Gertiser ML, et al. Serology and longevity of immunity against *Echinococcus granulosus* in sheep and llama induced by an oil-based EG95 vaccine. *Parasite Immunology*. 2016;38(8): 1–7. <https://doi.org/10.1111/pim.12325>.
135. Perera DJ, Ndao M. Promising Technologies in the Field of Helminth Vaccines. *Frontiers in Immunology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711650>.
136. Bitakaramire PK. Radio-isotope studies on *Fasciola gigantica* infection of cattle. In: *Isotopes and Radiation in Parasitology II*. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency; 1970. p. 35–43.
137. Oldham G. Protection against *Fasciola hepatica* in rats with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of antigen batch, antigen dose and number of sensitising injections. *Research in Veterinary Science*. 1983;34(2): 240–244.
138. Haroun ETM, Hillyer G V. Resistance to fascioliasis - a review. *Veterinary Parasitology*. 1986;20(1–3): 63–93. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(86\)90093-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(86)90093-2).
139. Harness E, Hughes DL, Doy TG. The demonstration of pre-hepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *International Journal for Parasitology*. 1976;6(1): 15–17. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(76\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(76)90005-9).
140. Donnelly S, Dalton JP, Robinson MW. How Pathogen-Derived Cysteine Proteases Modulate Host Immune Responses. In: Dalton JP, Robinson MW (eds.) *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*. Advances in Experimental Medicine and Biology; 2011. p. 192–207. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_12. [Accessed 29th January 2025].
141. Hodgkinson JE, Cwiklinski K, Beesley N, Hartley C, Allen K, Williams DJL. Clonal amplification of *Fasciola hepatica* in *Galba truncatula*: Within and between isolate variation of triclabendazole-susceptible and -resistant clones. *Parasites and Vectors*. 2018;11(363): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2952-z>.
142. Sotillo J, Toledo R, Mulvenna J, Loukas A. Exploiting Helminth-Host Interactomes through Big Data. *Trends in Parasitology*. 2017;33(11): 875–888. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2017.06.011>.

143. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S. An Integrated Transcriptomics and Proteomics Analysis of the Secretome of the Helminth Pathogen *Fasciola hepatica*: Proteins Associated with Invasion and Infection of the Mammalian Host. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009;8(8): 1891–1907. <https://doi.org/10.1074/mcp.m900045-mcp200>.
144. Wilson RA, Wright JM, de Castro-Borges W, Parker-Manuel SJ, Dowle AA, Ashton PD, et al. Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *International Journal for Parasitology*. 2011;41(13–14): 1347–1359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.003>.
145. Chemale G, Perally S, Lacourse EJ, Prescott MC, Jones LM, Ward D, et al. Comparative proteomic analysis of triclabendazole response in the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(10): 4940–4951. <https://doi.org/10.1021/pr1000785>.
146. Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, et al. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008;7(6): 1111–1123. <https://doi.org/10.1074/mcp.m700560-mcp200>.
147. Hernández-González A, Valero ML, Pino MS del, Oleaga A, Siles-Lucas M. Proteomic analysis of *in vitro* newly excysted juveniles from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2010;172(2): 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.04.003>.
148. McNulty SN, Tort JF, Rinaldi G, Fischer K, Rosa BA, Smircich P, et al. Genomes of *Fasciola hepatica* from the Americas Reveal Colonization with *Neorickettsia* Endobacteria Related to the Agents of Potomac Horse and Human Sennetsu Fevers. *PLOS Genetics*. 2017;13(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006537>.
149. Choi YJ, Fontenla S, Fischer PU, Le TH, Costábile A, Blair D, et al. Adaptive Radiation of the Flukes of the Family Fasciolidae Inferred from Genome-Wide Comparisons of Key Species. *Molecular Biology and Evolution*. 2020;37(1): 84–99. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz204>.
150. Pandey T, Ghosh A, Todur VN, Rajendran V, Kalita P, Kalita J, et al. Draft Genome of the Liver Fluke *Fasciola gigantica*. *ACS Omega*. 2020;5(19): 11084–11091. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0C00980>.
151. Haçarız O, Sayers GP. The omic approach to parasitic trematode research—a review of techniques and developments within the past 5 years. *Parasitology Research*. 2016;115(7): 2523–2543. <https://doi.org/10.1007/S00436-016-5079-1>.
152. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(12): 855–866. <https://doi.org/10.1038/nrg2897>.

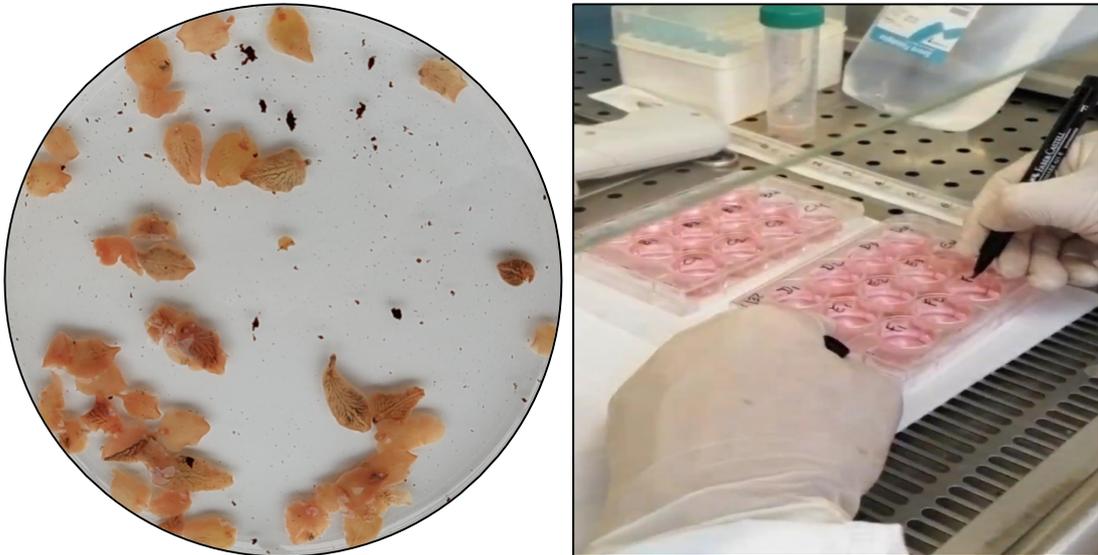
153. Poland GA, Oberg AL. Vaccinomics and bioinformatics: accelerants for the next golden age of vaccinology. *Vaccine*. 2010;28(20): 3509–3510. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.031>.
154. Andrews SJ, Cwiklinski K, Dalton JP. The Discovery of *Fasciola hepatica* and its Life Cycle. In: Dalton JP (ed.) *Fasciolosis*. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI International; 2022. p. 1–22. <https://doi.org/10.1079/9781789246162.0001>. [Accessed 4th July 2022].
155. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Fascioliasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1154: 71–103. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_4.
156. Dalton JP. *Fasciolosis*. 2nd ed. Fasciolosis II. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International; 2022. <https://doi.org/10.1079/9781789246162.0000>.
157. Virkel G, Lifschitz A, Sallovitz J, Pis A, Lanusse C. Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2006;29(3): 213–223. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2885.2006.00735.X>.
158. Moreno L, Ceballos L, Fairweather I, Lanusse C, Alvarez L. Time-course and accumulation of triclabendazole and its metabolites in bile, liver tissues and flukes collected from treated sheep. *Experimental Parasitology*. 2014;136(1): 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.014>.
159. Smeal MG, Hall CA. The activity of triclabendazole against immature and adult *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 1983;60(11): 329–331. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1983.TB02833.X>.
160. Maco V, Marcos L, Delgado J, Herrera J, Nestares J, Terashima A, et al. Efficacy and tolerability of two single-day regimens of triclabendazole for fascioliasis in Peruvian children. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015;48(4): 445–453. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0148-2015>.
161. Talaie H, Emami H, Yadegarinia D, Nava-Ocampo AA, Massoud J, Azmoudeh M, et al. Randomized trial of a single, double and triple dose of 10 mg/kg of a human formulation of triclabendazole in patients with fascioliasis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2004;31(11): 777–782. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2004.04093.X>.
162. Yadegari D, Talaie H, Massoud J. Clinical trial of triclabendazole on human fascioliasis: long term follow up. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*. 1999;13(2): 89–91. https://mjiri.iums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-298-398&sid=1&slc_lang=en
163. Toner E, Brennan GP, Hanna REB, Edgar HWJ, Fairweather I. Disruption of egg formation by *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with triclabendazole in the sheep host. *Veterinary Parasitology*. 2011;177(1–2): 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.032>.

164. Hanna R. *Fasciola hepatica*: Histology of the Reproductive Organs and Differential Effects of Triclabendazole on Drug-Sensitive and Drug-Resistant Fluke Isolates and on Flukes from Selected Field Cases. *Pathogens*. 2015;4(3): 431–456. <https://doi.org/10.3390/pathogens4030431>.
165. Overend D, Bowen F. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*. 1995;72(7): 275–276. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1995.TB03546.X>.
166. Brecht K, Kirchhofer C, Bouitbir J, Trapani F, Keiser J, Krähenbühl S. Exogenous Iron Increases Fasciocidal Activity and Hepatocellular Toxicity of the Synthetic Endoperoxides OZ78 and MT04. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(19): 4880. <https://doi.org/10.3390/ijms20194880>.
167. Eypasch E, Lefering R, Kum CK, Troidl H. Probability of adverse events that have not yet occurred: a statistical reminder. *British Medical Journal*. 1995;311(7005): 619–620. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.7005.619>.
168. Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Martínez-Sernández V, Ubeira FM, Mezo M. Current Challenges for Fasciolicide Treatment in Ruminant Livestock. *Trends in Parasitology*. 2021;37(5): 430–444. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.003>.
169. Morphew RM, Eccleston N, Wilkinson TJ, McGarry J, Perally S, Prescott M, et al. Proteomics and *in silico* approaches to extend understanding of the glutathione transferase superfamily of the tropical liver fluke *Fasciola gigantica*. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(12): 5876–5889. <https://doi.org/10.1021/pr300654w>.
170. Valderrama A. Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2016;(32): 121–129. <https://doi.org/10.19052/MV.3861>.

ANEXOS



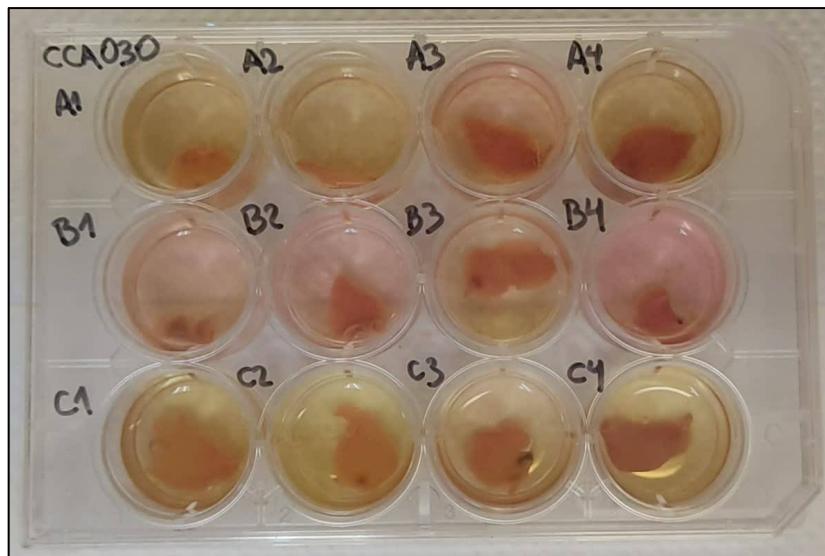
Anexo 1. Cortes realizados en la cara visceral de hígados de bovinos en el Matadero Municipal de Cajamarca para la inspección y colecta de fasciolas adultas



Anexo 2. Evaluación de fasciolas íntegras y activas para la incubación en placas de cultivo celular con RPMI-1640 suplementado



Anexo 3. Mantenimiento de fasciolas en incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 % para su evaluación diaria hasta la conformación de grupos experimentales



Anexo 4. Conformación de tres grupos experimentales con cuatro fasciolas cada uno para la exposición a TCBZ.SO o DMSO según corresponda en el lote



Anexo 5. *Fasciola hepatica* sin alteraciones luego de la exposición con TCBZ.SO



Anexo 6. *Fasciola hepatica* con ampollas visibles alrededor del borde tegumentario luego de la exposición con TCBZ.SO